

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Maja BORIĆ

**VPLIV VISKOZNOSTI MEDIJA NA
EKOFIZIOLOGIJO BAKTERIJE *Vibrio ruber***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Maja BORIĆ

**VPLIV VISKOZNOSTI MEDIJA NA EKOFIZIOLOGIJO
BAKTERIJE *Vibrio ruber***

DOKTORSKA DISERTACIJA

**THE EFFECT OF VISCOSITY ON ECOPHYSIOLGY OF *Vibrio
ruber***

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2013

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij z dne 14.3.2012 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Biomedicine, področje mikrobiologije. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. David Stopar.

Doktorska disertacija je zaključek doktorskega študijskega programa Biomedicina, smer mikrobiologija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. V njem opisane raziskave in poskusi so bili opravljeni na Katedri za mikrobiologijo, Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani. Kemična karakterizacija pigmenta je bila opravljena v laboratorijih Oddelka za tekstilstvo, Univerza v Kaliforniji - Davis, Kalifornija, ZDA.

Mentor: prof. dr. David Stopar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Romana Marinšek Logar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
Član: prof. dr. David Stopar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
Član: prof. dr. Andrej Jamnik
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Datum zagovora: 5. april 2013

Doktorska disertacija je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Doktorandka
Maja Borić

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd
DK UDK 579.22+579.266:579.843(043)=163.6
KG fiziologija mikroorganizmov/ ekologija mikroorganizmov/ viskoznost gojišča/
Vibrio ruber/ metabolna aktivnost/ naravni pigmenti/ prodigiozin/ medcelična
komunikacija/ odpornost proti UV sevanju/ bakterijski medvrstni odnosi
AV BORIĆ, Maja, univ. dipl. mikr.
SA STOPAR, David (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij
Biomedicina, področje mikrobiologija
LI 2013
IN VPLIV VISKOZNOSTI MEDIJA NA EKOFIZIOLOGIJO BAKTERIJE *Vibrio
ruber*
TD Doktorska disertacija
OP XVI, 140 str., 17 pregl., 39 sl., 18 pril., 314 vir.
IJ Sl
JI Sl/en
AI Viskoznost je fizikalno-kemijski dejavnik, ki je vedno prisoten v bakterijskem
okolju, in bistveno vpliva na dinamiko dogodkov na mikroskopskem nivoju. Dobro
so poznane razlike v fiziologiji celic pri obeh ekstremih viskoznosti – planktonskih
celicah in biofilmih. Kaj se s celicami dogaja v medijih z vmesno viskoznostjo ni
dobro poznano. V doktorski nalogi smo spremenjali viskoznost rastnega medija s
hidroksietil celulozo in spremljali delovanje modelnega organizma, bakterije *Vibrio
ruber*. Rezultati kažejo, da se hitrost rasti bistveno ne spreminja, medtem ko
metabolizem na nivoju celokupne dehidrogenazne aktivnosti in respiracije postaja z
višanjem viskoznosti bolj intenziven. Najbolj aktivna glikolitična pot je bila pot
pentoze fosfata, katere aktivnost se je z višanjem viskoznosti povišala. Pri visoki
viskoznosti je bakterija *V. ruber* zmanjšala sintezo sekundarnega metabolita
prodigiozina. Rezultati kažejo, da le-ta ščiti celice divjega tipa kot tudi mutante pred
UV stresom, hkrati pa zavira rast drugih, nesorodnih sevov. Ugotovili smo tudi, da
povišana viskoznost predstavlja večji stres v kombinaciji z neoptimalno temperaturo
gojenja ali slanostjo medija. Podobno kot bakterija *V. ruber* se na povišano
viskoznost medija odzove bakterija *V. harveyi*, medtem ko imata bakteriji *B. subtilis*
in *E. coli* drugačen odziv. Omenjeni rezultati nakazujejo, da je viskoznost medija
pomemben dejavnik okolja, ki lahko bistveno spremeni potek metabolizma pri
različnih bakterijah. Sprememba viskoznosti lahko vpliva tudi na interakcije med
bakterijami, vendar pa se tip odnosa (sobivanje, antagonizem) v testiranem rangu ni
spremenil. V kokulturah bakterije *V. ruber* z bakterijami *E. coli*, *B. subtilis* in
Bacillus sp. je bil odnos antagonističen, medtem ko so bakterije iz rodu *Vibrio* so
bolj ali manj uspešno sobivale. Rezultati kažejo, da prodigiozin deluje
bakteriostatično na bakterijo *E. coli*. Pri tej bakteriji je prodigiozin signifikantno
ustavil rast in razmnoževanje, znižal metabolno aktivnost, in vplival na preživetje
tretmaja z antibiotiki, ki zavirajo sintezo proteinov in celične stene.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 579.22+579.266:579.843(043)=163.6
CX microbial physiology/ microbial ecology/ growth medium viscosity/ *Vibrio ruber*/ metabolic activity/ natural pigments/ prodigiosin/ intercellular communication/ UV resistance/ bacterial interspecies relationships
AU BORIĆ, Maja
AA STOPAR, David (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biomedicine, field Microbiology
PY 2013
TI THE EFFECT OF VISCOSITY ON ECOPHYSIOLOGY OF *Vibrio ruber*
DT Doctoral dissertation
NO XVI, 140 p., 17 tab., 39 fig., 18 ann., 314 ref.
LA Sl
AL sl/en
AB Viscosity is an always present physico-chemical parameter that significantly affects dynamics on microscales. The differences in bacterial physiology in both viscosity extremes (i.e. planktonic cells and biofilms) are well known. However, physiologic response of bacteria in media with intermediate viscosities remains understudied. In this work we changed viscosity of growth media with hydroxyethyl cellulose and determined physiological status of the model organism *Vibrio ruber*. Results indicate that growth rates were not significantly altered, while the total dehydrogenase activity and cell respiration were increased in viscous media. The most active glycolytic pathway was pentose phosphate pathway, which was increasingly more active with increasing viscosity. The synthesis of prodigiosin, secondary metabolite in *V. ruber*, decreased. Prodigiosin protects wild type as well as non-pigmented mutant cells against UV stress. On the other hand, it inhibits growth of non-related bacteria. Results also suggest that increased viscosity was even more stressful when combined with non optimal temperature or salinity. Only closely related *V. harveyi* responded similarly to increased viscosity as *V. ruber*, whereas *B. subtilis* in *E. coli* had a different physiological response to changed viscosity. Obtained results indicate that viscosity is an important environmental factor that significantly alters metabolic activity and physiological status of different bacteria. Susceptibility of strains to prodigiosin dictated the outcome of co-culture experiments. Relationship of *V. ruber* with *E. coli*, *B. subtilis* in *Bacillus* sp. was antagonistic, while bacteria from genus *Vibrio* coexisted. Prodigiosin act as a bacteriostatic agent for *E. coli*. Prodigiosin treated *E. coli* ceased to growth, stopped dividing, had decreased metabolic activity and increased resistance to antibiotics that inhibit protein synthesis and cell wall synthesis.

KAZALO VSEBINE

| | |
|--|-----------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA..... | III |
| KEY WORDS DOCUMENTATION..... | IV |
| KAZALO VSEBINE..... | V |
| KAZALO SLIK..... | VIII |
| KAZALO PREGLEDNIC..... | XII |
| KAZALO PRILOG..... | XIV |
| OKRAJŠAVE IN SIMBOLI..... | XV |
| | |
| 1 UVOD | 1 |
| 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA | 1 |
| 1.2 HIPOTEZE | 2 |
| 1.3 CILJI..... | 3 |
| | |
| 2 PREGLED OBJAV | 4 |
| 2.1 VISKOZNOST | 4 |
| 2.1.1 Merjenje viskoznosti | 4 |
| 2.1.2 Viskoznost kot dejavnik okolja | 5 |
| 2.2 CENTRALNI METABOLIZEM BAKTERIJ | 6 |
| 2.3 PRILAGODITEV NA TEMPERATURNI, OSMOTSKI IN UV STRES | 11 |
| 2.4 VPLIV SPREMemb VISKOZNOSTI NA BAKTERIJE | 13 |
| 2.4.1 Gibanje bakterij in viskotaksa | 13 |
| 2.4.2 Fiziološko stanje in metabolna aktivnost | 15 |
| 2.4.3 Medcelična komunikacija | 18 |
| 2.4.4 Bakterijski medvrstni odnosi..... | 23 |
| 2.4.4.1 Javno dobro | 25 |
| 2.5 OPIS PROUČEVANIH BAKTERIJ | 26 |
| 2.5.1 Bakterija <i>Vibrio ruber</i> | 26 |
| 2.5.1.1 Prodigiozin | 26 |
| 2.5.2 Bakterija <i>Vibrio harveyi</i> | 28 |
| 2.5.3 Bakterija <i>Escherichia coli</i> | 29 |
| 2.5.4 Bakterija <i>Bacillus subtilis</i> | 29 |
| | |
| 3 MATERIAL IN METODE DELA..... | 31 |
| 3.1 MATERIAL | 31 |
| 3.1.1 Kemikalije | 31 |
| 3.1.2 Encimi | 32 |
| 3.1.3 Kompleti | 33 |
| 3.1.4 Antibiotiki | 33 |
| 3.1.5 Sestava gojišč | 33 |
| 3.1.5.1 Gojišče M9 | 33 |
| 3.1.5.2 Gojišče PKS..... | 33 |
| 3.1.5.3 Gojišče LB | 34 |
| 3.1.6 Bakterijski sevi in plazmidi | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2 METODE | 34 |
| 3.2.1 Spreminjanje viskoznosti rastnih medijev in meritve viskoznosti | 34 |
| 3.2.1.1 Fizikalno-kemijske lastnosti rastnega medija | 35 |
| 3.2.1.2 Celulolitična aktivnost bakterijskih sevov | 35 |
| 3.2.2 Gojenje bakterijskih sevov in določanje parametrov rasti | 36 |
| 3.2.3 Velikost in običkanost celic | 37 |
| 3.2.4 Metabolna aktivnost celic | 37 |
| 3.2.4.1 Merjenje mikrobne respiracije s plinsko kromatografijo | 37 |
| 3.2.4.2 Spektrofotometrično določanje celokupne dehidrogenazne aktivnosti bakterijskih celic | 37 |
| 3.2.4.3 Aktivnost glikolitičnih encimov | 38 |
| 3.2.4.4 Koncentracija L-prolina | 39 |
| 3.2.4.5 Sinteza EPS | 39 |
| 3.2.5 Sekundarni metabolizem bakterije <i>Vibrio ruber</i> | 40 |
| 3.2.5.1 Karakterizacija prodigiozinu podobnega pigmenta | 40 |
| 3.2.5.2 Dinamika sinteze prodigiozina | 40 |
| 3.2.5.3 Vpliv L-prolina, L-metionina in ATP na dinamiko sinteze prodigiozina | 42 |
| 3.2.5.4 Fitnes prezgodaj pigmentiranih celic | 42 |
| 3.2.6 Medcelična komunikacija | 42 |
| 3.2.7 Odpornost proti UV sevanju | 43 |
| 3.2.7.1 Vpliv viskoznosti na odpornost proti UV sevanju | 44 |
| 3.2.8 Kokulture | 44 |
| 3.2.8.1 Gojenje kokultur | 44 |
| 3.2.8.2 Vrednosti MIK, MIK ₅₀ in MBK | 45 |
| 3.2.9 Mehanizem protibakterijskega delovanja prodigiozina | 45 |
| 3.2.9.1 Tretiranje bakterije <i>E. coli</i> z ekstraktom prodigiozina | 45 |
| 3.2.9.2 Prevzem prodigiozina | 46 |
| 3.2.9.3 Morfologija in intaktnost membrane s prodigiozinom tretiranih bakterijskih celic | 46 |
| 3.2.9.4 Izolacija in tretiranje kromosomalne DNK s prodigiozinom | 46 |
| 3.2.9.5 Priprava seva s fuzijo <i>sulA-gfp</i> in indukcija SOS odziva | 47 |
| 3.2.9.6 Metabolna aktivnost s prodigiozinom tretiranih celic | 47 |
| 3.2.9.7 Občutljivost na tretiranje z antibiotiki | 47 |
| 3.2.10 Statistična obdelava rezultatov | 48 |
| 4 REZULTATI..... | 49 |
| 4.1 SPREMINJANJE VISKOZNOSTI RASTNEGA MEDIJA IN FIZIKALNO-KEMIJSKE ZNAČILNOSTI LE-TEGA | 49 |
| 4.2 VPLIV VISKOZNOSTI MEDIJA NA FIZIOLOGIJO BAKTERIJE <i>VIBRIO RUBER</i> | 50 |
| 4.2.1 Viskoznost kot samostojen dejavnik okolja | 50 |
| 4.2.1.1 Rast, spremembe viskoznosti in sinteza EPS | 50 |
| 4.2.1.2 Metabolna aktivnost | 55 |
| 4.2.1.3 Sekundarni metabolizem – sinteza pigmenta | 57 |
| 4.2.1.3.1 Karakterizacija prodigiozinu podobnega pigmenta | 57 |
| 4.2.1.3.2 Dinamika pigmentacije | 58 |

| | |
|--|------------|
| 4.2.1.4 Medcelična komunikacija in vpliv dostopnosti metabolnih intermediatov na začetek sinteze prodigiozina | 61 |
| 4.2.2 Viskoznost v kombinaciji z izbranimi dejavniki okolja | 64 |
| 4.2.2.1 Vpliv gojišča in viskoznosti | 64 |
| 4.2.2.2 Vpliv temperature in viskoznosti..... | 67 |
| 4.2.2.3 Vpliv slanosti in viskoznosti..... | 70 |
| 4.2.2.4 Vpliv UV sevanja | 73 |
| 4.2.2.4.1 Prodigiozin ščiti celice pred UV sevanjem..... | 73 |
| 4.2.2.4.2 Odpornost proti UV sevanju se zviša v viskoznih medijih | 81 |
| 4.3 FIZIOLOGIJA IZBRANIH BAKTERIJ V RAZLIČNO VISKOZNIH MEDIJIH . | 83 |
| 4.3.1 Viskoznost gojišč in bakterijskih kultur..... | 83 |
| 4.3.2 Rast in metabolna aktivnost | 84 |
| 4.3.3 Pretok ogljika skozi centralne metabolne poti..... | 87 |
| 4.4 VPLIV VISKOZNOSTI NA ODNOSE MED BAKTERIJAMI | 88 |
| 4.4.1 Vpliv viskoznosti na kokulturo bakterij <i>V. ruber</i> WT in <i>V. ruber</i> BM.... | 90 |
| 4.4.2 Vpliv viskoznosti na kokulturo bakterij <i>V. ruber</i> WT in <i>V. harveyi</i> | 91 |
| 4.4.3 Vpliv viskoznosti na kokulturo bakterij <i>V. ruber</i> WT in <i>E. coli</i> | 92 |
| 4.4.4 Vpliv viskoznosti na kokulturo bakterij <i>V. ruber</i> WT in <i>B. subtilis</i> | 93 |
| 4.4.5 Vpliv viskoznosti na kokulturo bakterij <i>V. ruber</i> WT in <i>Bacillus</i> sp..... | 94 |
| 4.5 MEHANIZEM PROTIBAKTERIJSKEGA DELOVANJA PRODIGIOZINA NA BAKTERIJO <i>ESCHERICHIA COLI</i> | 95 |
| 5 RAZPRAVA IN SKLEPI..... | 102 |
| 5.1 VPLIV VISKOZNOSTI NA FIZIOLOGIJO BAKTERIJE <i>VIBRIO RUBER</i> ... | 103 |
| 5.2 PRODIGIOZIN ŠČITI BAKTERIJO <i>VIBRIO RUBER</i> PRED UV SEVANJEM ... | 105 |
| 5.3 VPLIV VISKOZNOSTI NA FIZIOLOGIJO IZBRANIH BAKTERIJSKIH SEVOV | 107 |
| 5.4 VPLIV VISKOZNOSTI NA SOBIVANJE RAZLIČNIH BAKTERIJSKIH SEVOV IN MEHANIZEM PROTIBAKTERIJSKEGA DELOVANJA PRODIGIOZINA NA BAKTERIJO <i>E. COLI</i> | 109 |
| 5.5 SKLEPI..... | 111 |
| 6 POVZETEK (SUMMARY) | 113 |
| 6.1 POVZETEK | 113 |
| 6.2 SUMMARY | 114 |
| 7 VIRI | 116 |

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO SLIK

| | Stran |
|--|-------|
| Slika 1: Glikoliza po Embden-Meyerhoff-Parnasovi (EMP) poti (White, 2000). | 7 |
| Slika 2: Pot pentoze fosfata (White, 2000). | 9 |
| Slika 3: Shema poteka cikla citronske kisline (CCK) pri bakterijah (White, 2000). | 10 |
| Slika 4: Shema bakterijskih sistemov za zaznavanje celične gostote (Choudhary in Schmidt-Dannert, 2010). | 19 |
| Slika 5: Gradienti koncentracije signalnih molekul okoli producentske celice (Alberghini in sod., 2009). | 22 |
| Slika 6: Kemijska struktura prodigiozina (Williamson in sod., 2006). | 27 |
| Slika 7: Spremembe viskoznosti M9 medija pred (črtkana črta) in po inkubaciji z bakterijo <i>V. ruber</i> (prazni simboli). | 51 |
| Slika 8: Reologija kultur bakterije <i>V. ruber</i> po 24 urah rasti v M9 z 0 % (A), 0,1 % (B), 0,25 % (C), 0,5 % (D) in 1 % (E) skupaj reologijo pripadajočih sterilnih gojišč (polna črta). | 52 |
| Slika 9: Koncentracija reduksijskih koncev v gojišču M9 z 1 % HEC brez (črni kvadratki) in z 10 g/L glukozo (beli kvadratki) brez, na začetku in na koncu inkubacije z bakterijo <i>V. ruber</i> . | 53 |
| Slika 10: Količina EPS, ki ga je sintetizirala bakterija <i>V. ruber</i> do pozne eksponentne faze rasti pri različnih viskoznostih. | 54 |
| Slika 11: Metabolna aktivnost bakterije <i>V. ruber</i> gojene pri različnih viskoznostih minimalnega gojišča M9. | 56 |
| Slika 12: Skupni ionski kromatogram metanolnega ekstrakta pigmenta iz bakterije <i>V. ruber</i> DSM 14379 (A). LC/MS (B) in UV-VIS (C) spekter komponent ekstrakta N1 in N2. | 57 |
| Slika 13: Sinteza prodigiozina pri bakteriji <i>V. ruber</i> gojeni pri različnih viskoznostih. | 59 |
| Slika 14: Čas indukcije sinteze prodigiozina pri bakteriji <i>V. ruber</i> (A) in končna koncentracija prodigiozina po 24 urah rasti v M9 mediju z viskoznostjo 29,4 mPas (B), ko je bil dodan 10 µM ATP, 2 mM L-metionin, 10 mM L-prolin, ali kombinacija obeh aminokislin po 5,5 urah rasti. | 63 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Slika 15: | Dinamika sinteze prodigiozina pri bakteriji <i>V. ruber</i> v gojišču PKS s 3 % (w/V) NaCl z različnimi viskoznostmi. | 67 |
| Slika 16: | Učinkovitost delovanja bakterije <i>V. ruber</i> gojene pri različnih temperaturah (28 °C – beli šrafirani stolpci; 37 °C – temno sivi stolpci) ter različnih viskoznostih gojišča PKE in konstantni slanosti (3 % NaCl). | 68 |
| Slika 17: | Nosilnost okolja bakterije <i>V. ruber</i> gojene pri različnih temperaturah (28 °C – beli šrafirani stolpci; 37 °C – temno sivi stolpci) ter različnih viskoznostih gojišča PKE in konstantni slanosti. | 69 |
| Slika 18: | Učinkovitost delovanja bakterije <i>V. ruber</i> gojene pri različnih slanostih (0,5 % NaCl – svetlo sivi stolpci; 3 % NaCl – beli šrafirani stolpci; 10 % NaCl – temno sivi stolpci) ter različnih viskoznostih gojišča PKE in konstantni temperaturi. | 71 |
| Slika 19: | Nosilnost okolja bakterije <i>V. ruber</i> gojene pri različnih slanostih (0,5 % NaCl – svetlo sivi stolpci; 3 % NaCl – beli šrafirani stolpci; 10 % NaCl – temno sivi stolpci) ter različnih viskoznostih gojišča PKE in konstantni temperaturi. | 72 |
| Slika 20: | Spekter prodigiozina ekstrahiranega iz bakterije <i>V. ruber</i> WT ter spekter ekstrakta iz nepigmentirane mutante bakterije <i>V. ruber</i> BM. | 74 |
| Slika 21: | Krivilja preživetja UV sevanja bakterije <i>V. ruber</i> v različnih fazah rasti (faza prilagoditve (črni kvadratki), zgodnja faza logaritemske rasti (črni trikotniki), pozna faza logaritemske rasti (beli trikotniki), stacionarna faza rasti (beli kvadratki)). | 75 |
| Slika 22: | Relativni koeficient preživetja (beli kvadratki) ter koncentracija prodigiozina (črni kvadratki) v odvisnosti od časa rasti bakterije <i>V. ruber</i> . | 77 |
| Slika 23: | Maltuzijski fitnes bakterij <i>V. ruber</i> (črni simboli) in nepigmentirane mutante <i>V. ruber</i> (beli simboli) v različnih fazah rasti in po različnih dozah UV sevanja (A – 54 J/m ² ; B – 162 J/m ² in C – 324 J/m ²). | 78 |
| Slika 24: | Maltuzijski fitnes nepigmentirane mutante <i>V. ruber</i> po dodatku izoliranega prodigiozina iz divjega tipa po prejeti dozi sevanja 324 J/m ²). | 79 |

| | | |
|-----------|--|----|
| Slika 25: | Relativna zastopanost sevov <i>V. ruber</i> WT (sivi stolpci) in <i>V. ruber</i> BM (beli stolpci) gojenih v kokulturi in izpostavljenih različnim dozam UV sevanja. | 80 |
| Slika 26: | Fitnes bakterije <i>V. ruber</i> (A) in njene nepigmentirane mutante (B) gojene v PKS 3 % NaCl mediju z viskoznostjo 0,8 mPas (bela), 8,1 mPas (šrafirana) in 29,4 mPas (siva), ki so bile izpostavljene različnim dozam UV sevanja. | 82 |
| Slika 27: | Hitrost rasti in hitrost respiracije izbranih bakterijskih sevov gojenih v minimalnem M9 gojišču z različnimi viskoznostmi. | 86 |
| Slika 28: | Aktivnost encima glukoza-6-fosfat dehidrogenaza v celičnih ekstraktih bakterij <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> in <i>V. harveyi</i> gojenih v M9 gojišču z različnimi viskoznostmi. | 87 |
| Slika 29: | Fitnesi izbranih bakterijskih sevov gojenih 20 ur v kokulturi z bakterijo <i>V. ruber</i> WT (sivi stolpci) ali <i>V. ruber</i> BM (beli stolpci). | 88 |
| Slika 30: | Fitnes bakterije <i>V. ruber</i> WT (sivi stolpci) in njene nepigmentirane mutante (beli stolpci) po 20 urah rasti v kokulturi z začetnim razmerjem nacepljanja 2:1 (V:V) v korist divjega tipa. | 90 |
| Slika 31: | Fitnes bakterije <i>V. ruber</i> WT (sivi stolpci) in bakterije <i>V. harveyi</i> (beli stolpci) po 20 urah rasti v kokulturi z začetnim razmerjem nacepljanja 2:1 (V:V) v korist bakterije <i>V. harveyi</i> . | 91 |
| Slika 32: | Fitnes bakterije <i>V. ruber</i> WT (sivi stolpci) in bakterije <i>E. coli</i> (beli stolpci) po 20 urah rasti v kokulturi z začetnim razmerjem nacepljanja 2:1 (V:V) v korist bakterije <i>E. coli</i> . | 92 |
| Slika 33: | Fitnes bakterije <i>V. ruber</i> WT (sivi stolpci) in bakterije <i>B. subtilis</i> (beli stolpci) po 20 urah rasti v kokulturi z začetnim razmerjem nacepljanja 3:1 (V:V) v korist bakterije <i>B. subtilis</i> . | 93 |
| Slika 34: | Fitnes bakterije <i>V. ruber</i> WT (sivi stolpci) in bakterije <i>Bacillus</i> sp. (beli stolpci) po 20 urah rasti v kokulturi z začetnim razmerjem nacepljanja 3:1 (V:V) v korist bakterije <i>Bacillus</i> sp. | 94 |
| Slika 35: | Rastne krivulje bakterije <i>E. coli</i> tretirane z etanolom (beli kvadratki) in 10 (A), 60 (B) in 120 µg/mL (C) prodigiozina (črni kvadratki). | 96 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| Slika 36: | Prevzem prodigiozina aktivnih (živih) in neaktivnih (avtoklaviranih) celic <i>E. coli</i> po 5 urah tretmaja z 120 µg/mL prodigiozina. | 97 |
| Slika 37: | Fotografije celic <i>E. coli</i> tretiranih z etanolom (levo) in prodigiozinom (desno) pod invertnim fluorescenčnim mikroskopom s fluorescenčnimi filtri za zeleno fluorescentno barvilo SYTO 9 in rdeče fluorescentno barvilo propidijev iodid. | 98 |
| Slika 38: | Producija CO ₂ celic <i>E. coli</i> , ki so bile tretirane z 120 mg/L prodigiozina (črni kvadratki) ali etanolom (svetlo sivi kvadratki). | 99 |
| Slika 39: | Preživetje tretmaja z izbranimi antibiotiki bakterije <i>E. coli</i> , ki je bila predtretirana z etanolom (EtOH) oziroma 120 µg/mL prodigiozina (PG). | 100 |

KAZALO PREGLEDNIC

| | Stran |
|---|-------|
| Preglednica 1: Maksimalne hitrosti gibanja različnih bakterij ter viskoznosti, pri katerih se doseže maksimalna hitrost. | 14 |
| Preglednica 2: Tipi bakterijskih medvrstnih odnosov na podlagi fitnesa udeležencev (West in sod., 2006). | 24 |
| Preglednica 3: Običajni pogoji za rast proučevanih bakterijskih sevov. | 36 |
| Preglednica 4: Fizikalno-kemijske značilnosti gojišč z dodano hidroksietil celulozo (HEC). | 49 |
| Preglednica 5: Poraba kisika, CFU vrednosti, velikost celic, nosilnost okolja in tip običkanosti bakterije <i>V. ruber</i> gojene pri različnih viskoznostih. | 55 |
| Preglednica 6: Parametri dinamike sinteze prodigiozina pri bakteriji <i>V. ruber</i> . | 60 |
| Preglednica 7: Relativna koncentracija signalnih molekul in čas indukcije sinteze prodigiozina pri bakteriji <i>V. ruber</i> , ki je rasla pri različnih viskoznostih M9 gojišča. | 61 |
| Preglednica 8: Število celic, koncentracija L-prolina in celokupna dehidrogenazna aktivnost bakterije <i>V. ruber</i> pri različnih viskoznostih gojišča po 5,5 urah rasti. | 62 |
| Preglednica 9: Hitrost rasti in metabolna aktivnost pri bakteriji <i>V. ruber</i> gojeni v gojišču PKS s 3 % (w/V) NaCl z različno viskoznostjo pri temperaturi 28 °C. | 65 |
| Preglednica 10: Sinteza prodigiozina pri bakteriji <i>V. ruber</i> v gojišču PKS s 3 % (w/V) NaCl z različno viskoznostjo. | 66 |
| Preglednica 11: Koncentracija nastalega prodigiozina v kulturah bakterije <i>V. ruber</i> gojenih v gojišču PKS 3 % NaCl in temperaturi 28 oziroma 37 °C. | 70 |
| Preglednica 12: Količina nastalega prodigiozina v kulturah bakterije <i>V. ruber</i> gojene v gojišču PKS z 0,5 oziroma 10 % NaCl. | 73 |
| Preglednica 13: Vrednosti F10 in IK za bakterijo <i>V. ruber</i> WT. | 76 |
| Preglednica 14: Primerjava Maltuzijskega fitnesa divjega tipa in nepigmentirane mutante bakterije <i>V. ruber</i> v monokulturah in ko-kulturah. | 81 |

| | | |
|-----------------|--|----|
| Preglednica 15: | Fitnesi bakterije <i>V. ruber</i> (WT) in njene nepigmentirane mutante gojene v PKS 3 % NaCl mediju z različnimi viskoznostmi v monokulturi ali kokulturi, ki so bile izpostavljene dozi UV sevanja 342 J/m ² . | 83 |
| Preglednica 16: | Viskoznost sterilnih gojišč in bakterijskih kultur <i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i> in <i>V. harveyi</i> , ki so rasle 24 ur v minimalnem mediju M9 z različnimi koncentracijami HEC. | 84 |
| Preglednica 17: | MIK, MIK ₅₀ in MBK vrednosti za prodigiozin za izbrane bakterijske seve. | 89 |

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Rast proučevanih bakterijskih sevov na HEC kot edinem viru ogljika.
- Priloga B: LC-MS/MS (A) in UV-VIS (B) spekter komponente N3 ekstrakta pigmenta.
- Priloga C: ESI-MS/MS spekter komponente N4 ekstrakta pigmenta.
- Priloga D1: Hitrost rasti in hitrost respiracije bakterije *V. ruber* pri povišani temperaturi gojenja v kombinaciji s spremenjeno viskoznostjo.
- Priloga D2: Hitrost rasti in hitrost respiracije bakterije *V. ruber* pri različnih slanostih v kombinaciji s spremenjeno viskoznostjo
- Priloga E: Absorpcijski spekter hidroksietil celuloze (HEC) v treh koncentracijah v vodi.
- Priloga F: Fizikalno-kemijski parametri gojišč s HEC za bakterijske seve *E. coli*, *B. subtilis*, *V. harveyi*.
- Priloga G: Koncentracija redukcijskih koncev na začetku in koncu 24 ur rasti bakterijskih sevov *E. coli*, *B. subtilis*, *V. harveyi* v gojišču M9 z 1 % HEC kot edinim virom ogljika.
- Priloga H: Reologija gojišč in bakterijskih kultur *E. coli*, *B. subtilis*, *V. harveyi* po 24 urah rasti.
- Priloga H1: Gojišča M9 z različnimi koncentracijami HEC.
- Priloga H2: Reologija kultur bakterije *E. coli*
- Priloga H3: Reologija kultur bakterije *B. subtilis*
- Priloga H4: Reologija kultur bakterije *V. harveyi*
- Priloga I: Aktivnost encimov glikolize bakterij *E. coli*, *B. subtilis* in *V. harveyi* gojenih pri različnih viskoznostih medija
- Priloga I1: Aktivnost encimov glikolize bakterije *E. coli*
- Priloga I2: Aktivnost encimov glikolize bakerije *B. subtilis*
- Priloga I3: Aktivnost encimov glikolize bakterije *V. harveyi*
- Priloga J: Koncentracija prodigiozina v kokulturah bakterije *V. ruber* WT z bakterijami *V. ruber* BM, *V. harveyi*, *E. coli*, *B. subtilis* in *Bacillus* sp.
- Priloga K: Tretiranje bakterije *E. coli* s prodigiozinom v treh zaporednih ciklih.
- Priloga K1: Rastne krivulje bakterije *E. coli* tretirane z 120 µg/mL prodigiozina v treh zaporednih ciklih.
- Priloga K2: Fitnes bakterije *E. coli* 5 h (beli stolpci) in 21,5 h (sivi stolpci) po tretmaju s 120 µg/mL prodigiozina v treh ciklih.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| | |
|-----------------|---|
| ADP | adenozin difosfat |
| AHL | acilhomoserin lakton |
| Amp | ampicilin |
| AI-2 | avtoinduktor 2 |
| AIP | avtoinduktorski protein |
| ATP | adenozin trifosfat |
| CCK | cikel citronske kislina |
| CFU | enote, iz katerih se je razvila posamezna kolonija |
| CoA | koencim A |
| CTAB | cetiltrimetilamonijev bromid |
| Da | dalton |
| DNK | deoksiribonukleinska kislina |
| DNS | dinitro salicilna kislina |
| DSM | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland |
| EPS | zunajcelične polimerne substance |
| Ery | eritromicin |
| EtOH | etanol |
| F ₁₀ | doza UV sevanja, ki vodi do inaktivacije 90 % bakterijske populacije |
| FFK | fosfofruktokinaza |
| GFP | zeleni fluorescenčni protein |
| GPD | glukoza 6-fosfat dehidrogenaza |
| GTP | gvanozin trifosfat |
| HEC | hidroksietil celuloza |
| IK | inaktivacijska konstanta |
| Kn | kanamicin |
| LB | gojišče Luria-Bertani |
| LC/MS | tekočinska kromatografija povezana z masno spektroskopijo |
| M9 | minimalno gojišče z M9 solmi |

| | |
|-------------------|--|
| MBK | minimalna baktericidna koncentracija |
| MC | metil celuloza |
| MIK | minimalna inhibitorna koncentracija |
| MIK ₅₀ | minimalna inhibitorna koncentracija, ki inhibira 50 % celične aktivnosti |
| MIV | minimalna imobilizacijska viskoznost |
| <i>m/z</i> | razmerje mase proti naboju |
| NADH | nikotinamid adenin dinukleotid |
| NADPH | nikotinamid adenin dinukleotid fosfat |
| NMR | jedrska magnetna resonanca |
| OD | optična gostota |
| OD ₆₅₀ | optična gostota pri 650 nm |
| PK | piruvat kinaza |
| PKS | gojišče pepton-kvasni ekstrakt |
| PG | prodigiozin |
| PVP | polivinil pirolidon |
| QS | sistem za zaznavanje celične gostote |
| RNK | ribonukleinska kislina |
| SYTO 9 | zeleno fluorescenčno barvilo, ki se veže na DNK |
| TTC | tetrazolijev klorid |
| TTF | tetrazilijev formazan |
| UV | ultravijoličen |
| UV-VIS | ultraviolična in vidna svetloba |
| VBNC | živo, vendar nekultivabilno stanje celične populacije |
| w/V % | utežno volumski odstotek |
| WT | divji tip |

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Viskoznost je dejavnik okolja, ki bistveno vpliva na difuzijo molekul in potek njihovega transporta. To je za bakterije ključnega pomena, saj na ta način pridobivajo hranila za rast. Znano je, da povišana viskoznost oteži gibanje bakterij, zaradi česar težje dostopajo do hrani. Poleg tega je od difuzije molekul odvisno tudi izražanje genov, ki so kontrolirani s sistemom za zaznavanje celične gostote (ang. quorum sensing). Dva najbolj raziskana ekstrema viskoznosti, v katerih se v okolju bakterije lahko nahajajo, so tekoči mediji z nizko viskoznostjo oziroma na drugi strani biofilmi z visoko viskoznostjo. V obeh omenjenih okoljih se izražanje genov in delovanje bakterij močno razlikuje. Oba ekstrema izpuščata veliko okolij z vmesno viskoznostjo, kot so na primer človeški mukus, solze in slina. Kako bakterije prilagajajo svoj metabolizem v okoljih z vmesno viskoznostjo je slabo poznano. Takšna okolja niso pomembna le v medicini, ampak tudi na drugih področjih, kot so čistilne naprave (vpliv na aktivno blato), industrija (npr. proizvodnja barv) in biotehnologija (npr. sredstva za zgostitev).

V doktorski nalogi smo zato skušali ugotoviti, kako je fiziologija bakterije *Vibrio ruber*, kot modelnega organizma, odvisna od viskoznosti okolja. Omenjena bakterija je bila izolirana iz estuarijskega okolja, v katerem je pojav cvetenja morja zaradi razmnoževanja mikroorganizmov pogost. Viskoznost tega okolja se ne spreminja le zaradi temperature, ampak tudi zaradi prisotnosti polisaharidov, ki nastajajo med cvetenjem morja. Polisaharidi lahko bistveno zvišajo viskoznost lokalnega okolja bakterijskih celic. Po drugi strani so bakterije iz rodu *Vibrio* sposobne tvoriti visoko viskozne biofilme, kar pomeni, da je bakterija *V. ruber* v svojem naravnem okolju lahko izpostavljena spremembam v viskoznosti.

Fiziološko stanje celic smo opisali s pomočjo parametrov, kot so npr. hitrost rasti, hitrost respiracije, celokupna dehidrogenazna aktivnost, pretok ogljika po različnih metabolnih poteh in sinteza zunajceličnih polisaharidov ter rdečega pigmenta. Slednji je podoben prodigiozinu, ki je poznan kot protimikrobeno, protivnetno in protirakavo sredstvo, in je zato biotehnološko zanimiv. Znano je, da je sinteza tega pigmenta podvržena sistemu za zaznavanje celične gostote, za katerega je bistvena difuzija signalnih molekul med celicami. V nalogi smo proučevali tudi, kako viskoznost v kombinaciji z nekaterimi drugimi dejavniki okolja (temperatura, slanost in UV sevanje), ki so pomembni v

naravnem okolju bakterije *Vibrio ruber*, vpliva na njeno fiziologijo. Preverili smo tudi, kako se na povišano viskoznost okolja odzovejo nekatere izbrane bakterijske vrste; *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* in *Vibrio harveyi*. Ker viskoznost lahko vpliva na medvrstne odnose med bakterijami, smo zgoraj omenjene seve gojili v kokulturah in določili, kako se njihovi fitnesi spreminja v različnih pogojih. To je ena izmed prvih raziskav o fiziološkem stanju bakterij v različno viskoznih medijih. Pridobljeni rezultati bi lahko bistveno pripomogli k boljšemu razumevanju delovanju mikroorganizmov v medijih s povišano viskoznostjo, kot tudi razširjanju znanja o poteku medcelične komunikacije in bakterijskih medvrstnih odnosov.

1.2 HIPOTEZE

Delovne hipoteze, ki smo si jih postavili v doktorski nalogi, so:

- viskoznost vpliva na fiziološko stanje bakterije *V. ruber*:
 - zvišana viskoznost povzroči nižjo hitrost rasti ter oteži sintezo pigmenta in EPS
 - z višanjem viskoznosti se povečuje intenzivnost metabolizma
- vpliv viskoznosti na fiziološko stanje bakterije *V. ruber* je odvisen od ostalih dejavnikov okolja:
 - neoptimalna slanost in višja temperatura skupaj s povišano viskoznostjo predstavljata za bakterijo večji stres kot povišana viskoznost sama
 - letalni učinki UV sevanja na bakterijo *V. ruber* se z višanjem viskoznosti manjšajo
- hitrost rasti in intenzivnost metabolizma bakterij *E. coli*, *B. subtilis* in *V. harveyi* sta spremenjena v medijih z višjo viskoznostjo
- viskoznost spreminja tip medvrstnega odnosa (sobivanje, parazitizem, tekmovanje) med bakterijo *V. ruber* in bakterijami, s katerimi sobiva:
 - tip medvrstnega odnosa je povezan z občutljivostjo bakterijskih sevov na prodigiozin
 - z naraščajočo viskoznostjo se zmanjšuje protibakterijsko delovanje pigmenta izoliranega iz bakterije *V. ruber*.

1.3 CILJI

Namen raziskovalnega dela je pokazati, da:

- je viskoznost pomemben dejavnik okolja, ki vpliva na fiziologijo različnih bakterij,
- je sinteza prodigiozina odvisna od viskoznosti, medcelične komunikacije ter od metabolnega statusa celic in razpoložljivih intermediatov za sintezo pigmenta,
- prodigiozin, ki ga proizvaja bakterija *V. ruber*, lahko ščiti celice pred UV sevanjem,
- viskoznost vpliva na odnose med različnimi bakterijami, ki so v kokulturi.

2 PREGLED OBJAV

2.1 VISKOZNOST

Viskoznost je mera za odpornost tekočine na deformacijo in podaja notranje trenje tekočine pri toku. Od nje je odvisna hitrost toka tekočine, saj se viskozne tekočine težje pretakajo in mešajo. V idealnih, neviskoznih kapljevinah ni strižnih sil, tako da lahko plasti tekočine polzijo neovirano druga mimo druge. V realnih tekočinah pa temu ni tako, saj zaradi viskoznosti počasnejše plasti zadržujejo hitrejše. Tako nastane v smeri, ki je pravokotna na plasti tekočine, gradient hitrosti (strižna hitrost). Med sosednjima plastema deluje strižna sila (F), ki je sorazmerna velikosti stične ploskve S in strižni hitrosti. Pri ravnih plasteh, kjer se hitrost spreminja le v prečni smeri, je strižna hitrost enaka $\delta v / \delta y$, to je spremembi hitrosti na enoto prečne razdalje (Stepišnik, 1997). Torej velja

$$F = \eta \frac{\delta v}{\delta y} S . \quad \dots(1)$$

Sorazmernostni koeficient η imenujemo koeficient viskoznosti oziroma viskoznost. Enota zanjo je $1 \text{ kg m}^{-1} \text{ s}^{-1} = \text{N s m}^{-2} = \text{Pa s}$ (pascal sekunda) (Stepišnik, 1997). Viskoznost je neodvisna od tlaka (razen pri izjemno visokih tlakih), kaže pa močno odvisnost od temperature (Stepišnik, 1997), pri čemer se viskoznost tekočine z višanjem temperature manjša. Na mikroskopski skali igra viskoznost veliko vlogo v dinamiki fizikalnih, kemijskih in bioloških sistemov, na primer na dinamiko molekul proteinov in njihove interakcije z ostalimi molekulami. Tudi razumevanje difuzijskih in transportnih procesov v bližini in na površini celic, ki vplivajo na rast, vključuje znanje o viskoznosti rastnega medija (Nemet in sod., 2002).

2.1.1 Merjenje viskoznosti

Viskoznost lahko določimo na različne načine in na različnih prostorskih skalah. Reologijo na makroskopski prostorski velikostni skali določamo z merjenjem i) pretoka kapljevine skozi kapilaro, ii) časa padanja kroglice v viskozni tekočini, iii) dušenja mehanskega nihanja (piezoelektrični oscilator) v tekočini ali iv) vrtenjem koaksialnih valjev v viskozni tekočini (Stepišnik, 1997). Pogosto uporabljana metoda je tudi rotacijski reometer, ki

določa viskoznost na podlagi vrtenja dveh vzporednih plošč, med katerima se nahaja vzorec (Kemblowski in Kristiansen, 2004).

Za določanje reologije na mikroskopski velikostni skali uporabljamo:

- **aktivne tehnike**, s katerimi podobno kot pri določanju viskoznosti pri klasični reologiji, na sondi delujemo s silo in merimo deformacijo medija (Osterman, 2009). Uporabljamo:
 - mikropipete (Evans in Skalak, 1980),
 - mikroskop na atomsko silo (Radmacher in sod., 1995),
 - optično pinceto (Valentine in sod., 1996; Borić, 2009; Osterman, 2009)
 - mikroreometer z magnetnimi kroglicami (Ziemann in sod., 1994; Amblard in sod., 1996; Bausch in sod., 1998).
- **pasivne tehnike**, s katerimi na podlagi termične fluktuacije sond (ponavadi inertnih kroglic različnih velikosti) v merjenem materialu in njihove difuzije izračunamo linearni kompleksni strižni modul (Mason in sod., 1997; Gisler in Weitz, 1998).

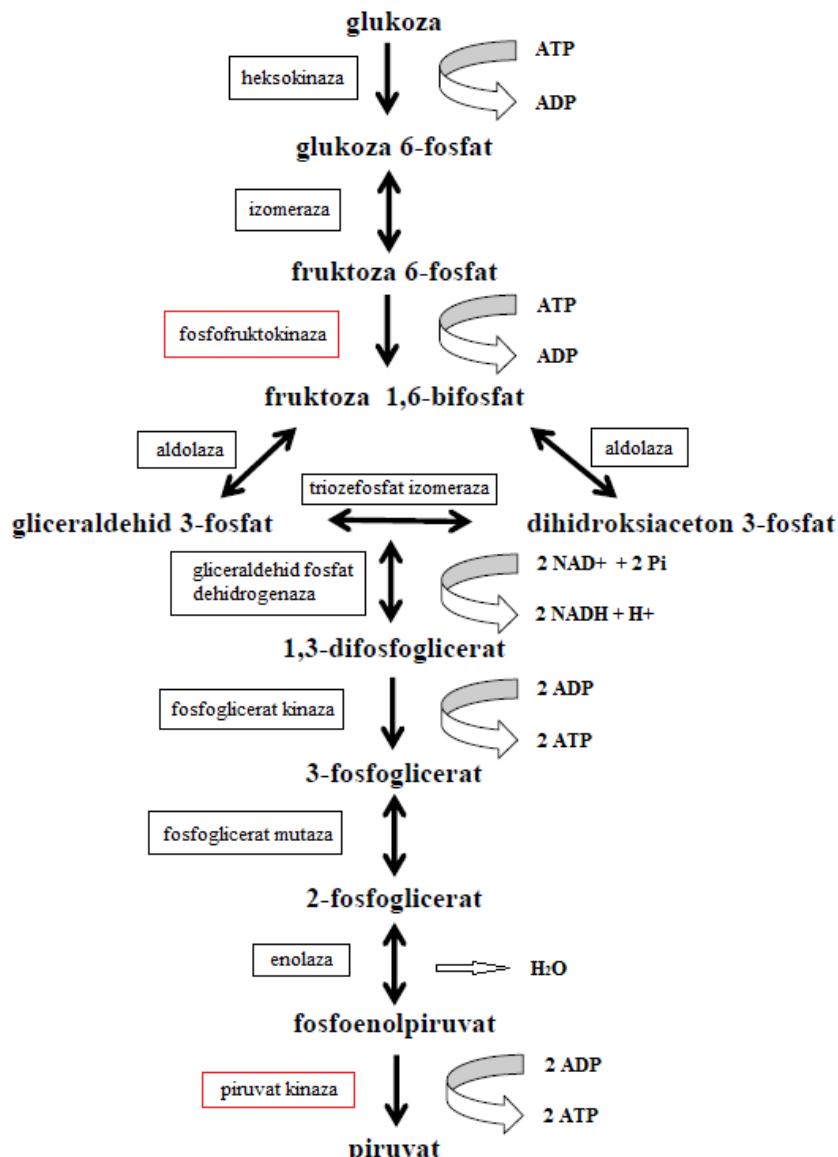
2.1.2 Viskoznost kot dejavnik okolja

Viskoznost je osnovna značilnost tekočin in je pomembna za tip toka tekočine, za difuzijo molekul ter potek transportnih procesih (Kao in sod., 1993; Swaminathan in sod., 1996), zato na mikroskopskem nivoju vpliva na dinamiko fizikalnih, kemijskih in bioloških sistemov. Reološke značilnosti citoplazme celic vplivajo na mnoge znotrajcelične procese, kot so transport topljencev, encimske reakcije, dinamika proteinov in interakcije med različnimi molekulami (Fushimi in Verkman, 1991; Srivastava in Krishnamoorthy, 1997; Jacob in Schmid, 1999; Nemet in sod., 2002; Sampedro in sod., 2002; Uribe in Sampedro, 2003; Hagen, 2010; Nenninger in sod., 2010). Viskoznost citoplazme bakterijskih in tudi drugih celic se ne sme drastično spremenjati, saj bi drugače lahko prihajalo do motenj pri celičnih procesih. Viskoznost citoplazem različnih celic se razlikuje, vendar ostaja podobna ali rahlo višja od viskoznosti vode (Fushimi in Verkman, 1991; Srivastava in Krishnamoorthy, 1997). Do razlik v viskoznosti posameznih delov citoplazme prihaja zaradi kompartmentizacije citoplazme, strukturiranja vode zaradi prisotnosti makromolekul, fizičnih omejitev (membrana) in različnih koncentracij majhnih topljencev in makromolekul (Srivastava in Krishnamoorthy, 1997).

Voda in najbolj pogosto uporabljeni tekoči rastni mediji za bakterije imajo viskoznost 0,8 mPas, medtem ko se lahko viskoznost morske vode giblje med 0,8 in 1,8 mPas, odvisno od temperature in raztopljenih delcev (Foffonof, 1962). Takšna okolja imajo najnižjo, vendar najpogostejo viskoznost. Njihovo nasprotje so biofilmji, ki jih bakterije tvorijo na trdnih površinah ali interfazi med tekočino in zrakom, katerih viskoznost znaša od 1 do 10^8 Pas (Hall-Stoodley in sod., 2004; Cheong in sod., 2009). Okolja z viskoznostjo med obema ekstremoma so slina, solze ali mukus (Cone, 1999; Nielsen in sod., 2004; Rubin, 2007; Lai in sod., 2009), pri čemer je slednji najbolj pogost habitat bakterij v človeškem telesu. Prisotnost polimerov v raztopini bistveno poveča viskoznost, kar posledično pomeni, da lahko bakterije z izločanjem zunajceličnih polimernih substanc zvišujejo viskoznost svojega lokalnega okolja. Polimeri in z njimi povezana viskoznost igrajo pomembno vlogo tudi v procesu čiščenja voda, kot tudi v različnih industrijskih procesih (Sanin, 2002; Hasar in sod., 2004; Obidi in sod., 2009). Zato lahko trdimo, da je viskoznost kot dejavnik okolja vedno prisoten faktor, ki ima pomemben vpliv na procese, ki so ključni za delovanje mikroorganizmov. Med te spadajo gibljivost bakterij, fiziološko stanje celic (Davey in O'Tolle, 2000; Walters in sod., 2003; Fux in sod., 2005; Resch in sod., 2005; Resch in sod., 2006; Spormann, 2008; Stewart in Franklin, 2008), metabolna aktivnost mikrobnih združb (Wyatt in Archer, 1988), izražanje virulenčnih dejavnikov, medsebojna kooperacija sevov (Kümmerli in sod., 2009; Le Gac in Doebeli, 2010), ter odpornost proti antibiotikom (Kostenko in sod., 2007). Kljub temu do sedaj še ni bilo nobene sistematične raziskave, ki bi se poglobila v vplive viskoznosti na nivoju bakterijskega metabolizma.

2.2 CENTRALNI METABOLIZEM BAKTERIJ

Bakterijski metabolizem je ključen za delovanje celic, saj se v različnih procesih tvorijo pomembni intermediati za biosintezo, redukcijski ekvivalenti in energija v obliki ATP (Lehninger in sod., 2004; Boyer, 2005). V prvem koraku se metabolni substrat, najpogosteje glukoza, oksidira v procesu glikolize (Slika 1).



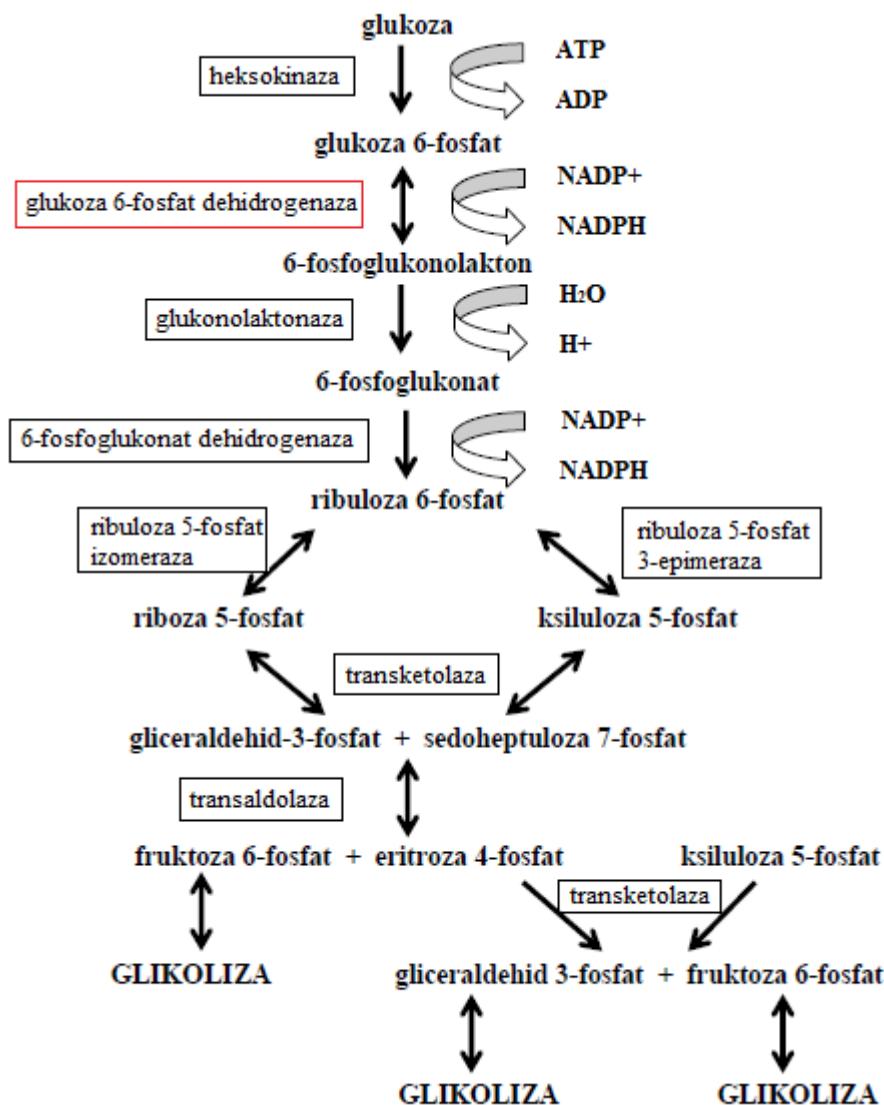
Slika 1: **Glikoliza po Embden-Meyerhoff-Parnasovi (EMP) poti** (White, 2000). Rdeče označena sta encima, katerih aktivnost smo spremljali.

Figure 1: **Emden-Meyerhoff-Parnas (EMP) glycolysis pathway** (White, 2000). Red colour marks the enzymes of which the activity was measured.

Pri bakterijah obstajata dve različici glikolize, Embden-Meyerhoff-Parnasova (EMP) in Entner-Doudoroffova (ED) pot. Prva reakcija oben je fosforilacija glukoze v glukoza-6-fosfat, potem pa se pri ED poti glukoza preko dveh glukonatov pretvori v fosfoenolpiruvat in piruvat. Ta končna stopnja je enaka zaključku glikolize po EMP poti. Energetski

izkupiček ED poti je 1 molekula ATP, 1 molekula NADH in 1 molekula NADPH na molekulo glukoze, medtem ko je izkupiček EMP poti po 2 molekuli NADH in ATP na molekulo glukoze. Poleg ključnih metabolnih intermediatov in energije pri obeh poteh nastaneta dve molekuli piruvata, ki lahko vstopata v nadaljnje metabolne reakcije, katerih končni rezultat je acetil-CoA. Le-ta lahko potem vstopa v drugi korak metabolizma, cikel citronske kisline (CCK). Bakterije lahko do acetil-CoA pretvorijo tudi nekatere maščobne kisline in tudi aminokisline.

Glukoza se lahko metabolizira tudi po tretji različici poti glikolize, poti pentoze fosfata (Slika 2). V njej se tvorijo sladkorji z različnim številom ogljikovih atomov, ob tem pa nastaja še veliko reduksijske moči v obliki NADPH molekul (Slika 2). Te spojine so pomembne za biosintezo nasičenih maščobnih kislin, amino kislin, nukleotidov in nukleinskih kislin, kot tudi aromatskih ter fenolnih spojin. Nekateri intermediati se lahko iz poti pentoze fosfata priključijo v glikolizo (Slika 2), kjer se metabolizirajo do piruvata (Slika 1) oziroma naprej do acetil-CoA (Slika 3).

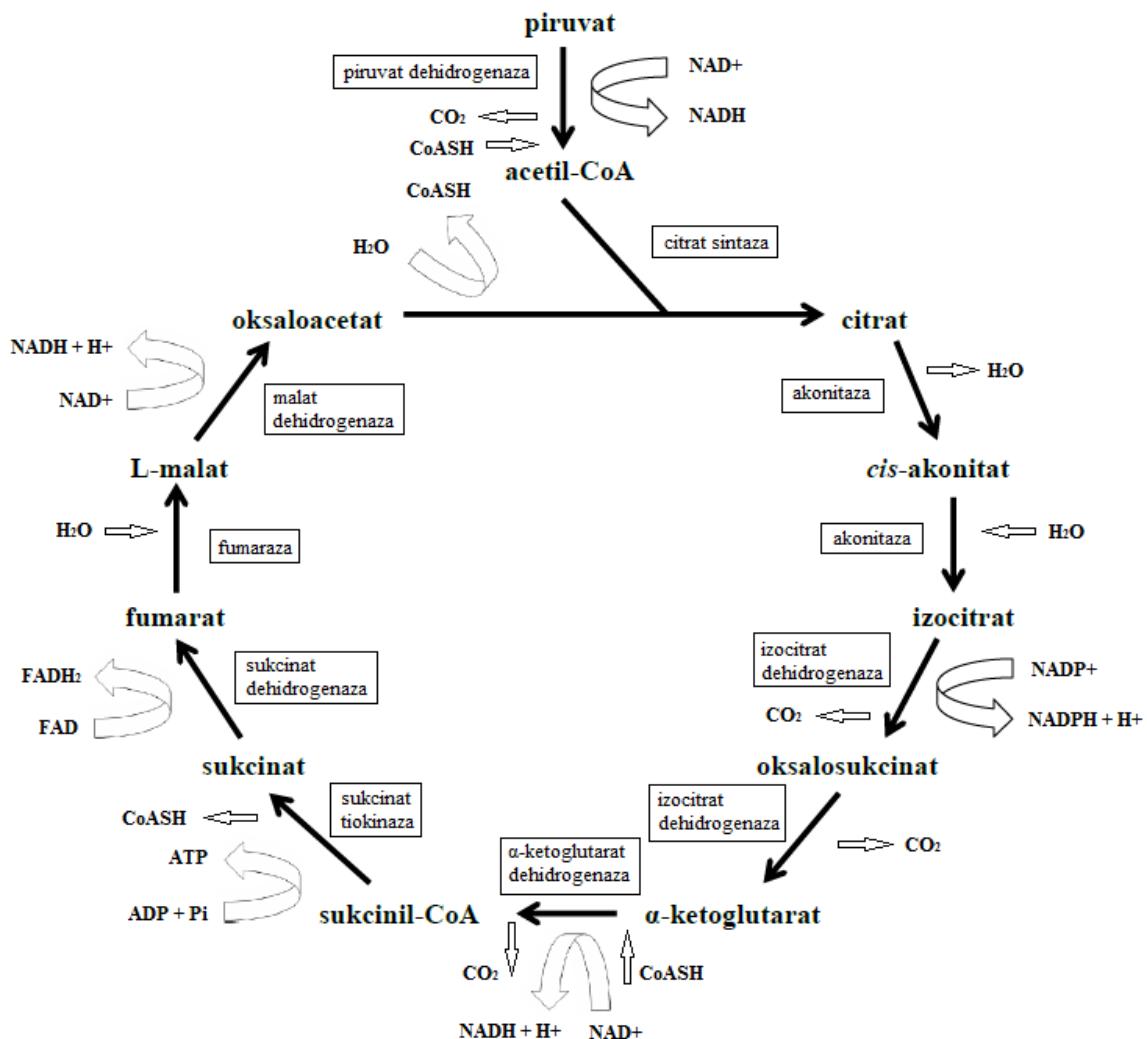


Slika 2: Pot pentoze fosfata (White, 2000). Rdeče označen je encim, katerega aktivnost smo spremljali.

Figure 2: Pentose phosphate pathway (White, 2000). Red colour marks the enzyme which activity was measured.

Acetil-CoA se v seriji reakcij encimsko oksidira do ogljikovega dioksida (CO_2), pri čemer se energija sprošča v obliki reduciranih prenašalcev elektronov (NADH , FADH_2). V CCK na molekulo glukoze nastaneta 2 molekuli GTP , 2 molekuli FADH_2 , 6 molekul NADH in 4 molekule CO_2 (Boyer, 2005). Cikel se ponavlja dokler traja zaloga piruvata iz glikolize, oziroma dokler celice nimajo dovolj metabolnih produktov in visokoenergetskih spojin (Boyer, 2005). CCK inhibirajo visoke koncentracije produktov, kot so NADH , ATP in acetil-CoA. Tudi iz cikla citronske kisline izhajajo pomembni intermediati za biosintezo in sicer (Boyer, 2005):

- alfa-ketoglutarat za sintezo glutamata, iz katerega se tvorijo purini in nekatere amino kisline,
- oksaloacetat za sintezo fosfoenolpiruvata in nekaterih amino kislin.



Slika 3: Shema poteka cikla citronske kisline (CCK) pri bakterijah (White, 2000).

Figure 3: Schematic representation of the citric acid cycle (CAC) in bacteria (White, 2000).

V zadnjem koraku centralnega metabolizma se reducirani prenašalci elektronov, NADH in FADH_2 molekule, v procesu oksidativne fosforilacije oksidirajo, pri čemer se sprostijo protoni in elektroni. Slednji se prenesejo do molekul kisika, ki se reducirajo v vodo. S prenašanjem elektronov je sklopljen prenos protonov na membrani, ki prehajajo skozi encime imenovane ATP sintaze. Le-te delujejo kot kanalček, skozi katerega se protoni

vračajo v matriks celic in porušijo protinski gradient. Ko protoni potujejo skozi ATP sintazo, se aktivira podenota, ki katalizira fosforilacijo molekul ADP v ATP (Boyer, 2005).

2.3 PRILAGODITEV NA TEMPERATURNI, OSMOTSKI IN UV STRES

Na spremembe fizikalno-kemijskih pogojev v naravnem okolju se bakterije prilagajajo na različne načine, proces prilagoditve pa je odvisen tudi od narave spremenjenega dejavnika. Najbolje preučeni odzivi na stres so pri spremembah temperature, slanosti, koncentracije kisika, pri pomanjkanju hrani in odziv na UV sevanje (Kim in Gadd, 2008).

Vsaka bakterija ima območje temperature, v katerem optimalno deluje. Na podlagi tega so razvrščene med psihrofile, mezofile in termofile (Madigan in Martinko, 2006). Če bakterije prenesemo v okolje z višjo temperaturo od njihovega optimuma, se začnejo izražati proteini toplotnega šoka (angl. heat shock proteins), ki preprečujejo denaturacijo celičnih struktur in molekul, pomagajo pri zvijanju proteinov ter omogočajo lažjo translokacijo proteinov v membrani (Kim in Gadd, 2008). Odziv na toplotni šok uravnavata dva sigma faktorja, σ^E in σ^H . Ker se z višanjem temperature povečuje tudi fluidnost membrane, se v membrano vgradijo bolj nasičene maščobne kisline, ki povišajo rigidnost (Sinensky, 1974). Ravno obratno se zgodi pri hladnem šoku (angl. cold shock), v katerem bakterije v svojih membranah akumulirajo nenasničene maščobne kisline (Sinensky, 1974; Kim in Gadd, 2008). Poleg sprememb v sestavi membrane, imajo celice bakterije *E. coli* tudi znižano hitrost rasti in nivo metabolizma (Ivančič in sod., 2009; Ivančič, 2012).

Tudi pri odzivu na spremembe v slanosti okolja se bakterijam spremeni sestava in urejenost membrane (Cullis in de Kruijff, 1979; Hanna in sod., 1984; Lindblom in Rilfors, 1992; de Kruijff, 1997), včasih pa se lahko spreminja tudi sam volumen celic (Rönsch in sod., 2003). V splošnem se bakterije poslužujejo dveh mehanizmov za prilaganje na osmotski stres, in sicer i) izenačevanje koncentracije soli oziroma vzdrževanje koncentracijskega gradiента ali ii) sinteza kompatibilnih topljencev (osmolitov) (Oren, 2001). Oba procesa zahtevata ATP (Oren, 2001; Varela in sod., 2004), zato ne čudi, da je bakterijska rast slabša in metabolizem intenzivnejši (Danevčič in sod., 2005; Danevčič, 2006; Danevčič in Stopar, 2011). Ob tem se lahko spremenijo še aktivnosti encimov (Ventosa in sod., 1998), transport preko ABC prenašalcev (Fox in sod., 2006) ter kemotaktično gibanje bakterij (Larsen in sod., 2004).

Prehod v stacionarno fazo rasti se zgodi, ko celicam zmanjkuje dostopnih hranil (Madigan in Martinko, 2006), kar v celicah sproži vrsto prilagoditvenih procesov. Upočasni se hitrost rasti, sinteza proteinov je v splošnem nižja, poviša pa se koncentracija (p)ppGpp (Kim in Gadd, 2008). Le-ta zviša izražanje splošnega regulatorja *rpoS* (σ^S), zaradi katerega se spremeni velikost in oblika celice, sestava membrane, nadzira pa tudi programirano celično smrt (Lewis, 2000; Kim in Gadd, 2008). S tem procesom se del celic žrtvuje, saj jih preživele lahko porabijo kot vir hranil. Ob aktivnem metabolizmu in rasti se v aerobnih kulturah niža tudi koncentracija kisika, zaradi česar se aktivirajo druge poti metabolizma, kot so uporaba alternativnih prejemnikov elektronov in fermentacija (Kim in Gadd, 2008). Posledica tega je različen potek CCK, aktivacija encimov kot sta fumarat reduktaza in nitrat reduktaza, spremembra v aktivnosti glioksilatnega cikla in metabolizma maščob.

Ultravijolično (UV) sevanje letalno učinkuje na vse mikroorganizme in lahko popolnoma ustavi njihovo delovanje (Qiu in sod., 2004), zato se pogosto uporablja kot način za sterilizacijo površin. Ker se celice že dolgo prilagajajo na UV (Cleaver, 2006), so razvile učinkovite mehanizme za preprečevanje ali popravljenje posledic sevanja, ki bistveno izboljšajo fitnes organizma (Qiu in sod., 2004). Za preprečevanje poškodb celice pogosto akumulirajo pigmente v svojih membranah ali slojih spor, ki jih ščitijo tako, da abosrbirajo pri valovnih dolžinah v UV območju (Cockell in Knowland, 1999; Nicholson in sod., 2000; Sinha in Hader, 2008; Dieser in sod., 2010; Rastogi in sod., 2010). Takšni pigmenti so melanin v različnih bakterijah in sporah, karotenoidi pri bakteriji *Deinococcus radiodurans*, sporah bakterij iz rodu *Bacillus* in pri cianobakteriji *Nostoc commune* (Ehling-Schultz in sod., 1997; Lemee in sod., 1997; Riesman in Nicholson, 2000; Hullo in sod., 2001; Saxena in sod., 2002; Moeller in sod., 2005; Geng in sod., 2008). Splošno razširjeni so tudi popravljalni mehanizmi. UV sevanje poškoduje DNK tako, da so onemogočeni procesi prepisovanja in prevajanja. Lahko pride tudi do mutacij, ki so za celice letalne. Popravljalni mehanizmi so rekombinacija, fotoreaktivacija, izrezovanje poškodovanih mest z endonukleazami in podobno (Goosen in Moolenaar, 2008). Poškodbe DNK pa celice omejujejo tudi s pomočjo SOS odziva (Radman, 1974). Pri bakteriji *E. coli* je SOS odziv reguliran z medsebojno prepletajočim delovanjem transkripcijskega represorja, dimernega proteina LexA z aktivnim filamentom proteina RecA, ki nastane na mestih poškodb DNK in aktivira samocepitev proteina LexA (Butala in sod., 2011). Že pri manjših poškodbah se popolnoma izrazijo geni *lexA*, *recA*, *uvrA*, *uvrB* in *uvrD*, katerih cilj je popolnoma popraviti poškodbe. Če se to ne zgodi se aktivira še izražanje genov *sulA*, *umuD* in *umuC*. Protein SulA ustavi celično delitev z inhibicijo oblikovanja proteinskega

obroča FtsZ, kar stimulira popravljanje poškodb s sistemom UmuDC (Lehninger in sod., 2004). Za delovanje teh procesov je nujna metabolna aktivnost celic.

2.4 VPLIV SPREMENB VISKOZNOSTI NA BAKTERIJE

2.4.1 Gibanje bakterij in viskotaksa

Viskoznost zunanjega okolja na bakterijske celice ima znaten vpliv na njihovo gibanje. Sposobnost gibanja pri višjih viskoznostih je odvisna od morfologije celic – od njihove velikosti ter tipa običkanosti. Dolge zavite bakterije iz rodov *Campylobacter*, *Helicobacter* in *Spirochaeta* so bolj gibljive v okoljih z visoko viskoznostjo kot kratke palčke ali koki (Ferrero in Lee, 1988; Nakamura in sod., 2006; Swidsinski in sod., 2007), načeloma pa visoka viskoznost imobilizira celice vseh bakterijskih vrst. Minimalna imobilizacijska viskoznost (MIV) je definirana kot viskoznost, pri kateri so celice popolnoma imobilizirane. Za bakteriji *E. coli* in *P. aeruginosa* je ta meja 60 mPas, za spirohete pa 1000 mPas ali več (Greenberg in Canale-Parola, 1977). Sposobnost zvijanja celic naj bi bila odločilna za vzdrževanje ali celo povišanje hitrosti plavanja spirohet v visoko viskoznih medijih (Greenberg in Canale-Parola, 1977). Mutanti bakterije *S. halophila* in *S. aurantia* imata MIV približno 70 do 120 oziroma 300 do 600 mPas, kar je bistveno nižje od njunih divjih tipov (Greenberg in Canale-Parola, 1977). Sposobnost gibanja spirohet je ključna ekološka prednost pri kolonizaciji mukusa gostitelja ali viskoznega blata in sedimenta (Kaiser in Doetsch, 1975). Tudi bakteriji *Leptospira interrogans* in *Treponema denticola* sta dobro gibljivi v visoko viskoznih medijih (Kaiser in Doetsch, 1975; Ruby in Charon, 1998), to pa jim najverjetneje omogoča spremembu celične morfologije (Cox in Twig, 1975). Gibljivost je pri kolonizaciji želodca za bakterijo *H. pylori* ključna, odvisna pa je od faze rasti, kar je povezano z morfologijo in običkanostjo celic (Kodaka in sod., 1982; Josahaus in sod., 1995; Worku in sod., 1999). Nedavno so Celli in sod. (2009) ugotovili, da se bakterija *H. pylori* giba skozi viskozni mukus s pomočjo zmanjševanja viskoelastičnosti mucina. To doseže s spremembami pH vrednosti preko aktivnosti ureaze. Na povišano viskoznost se odzivajo tudi slabše gibljive bakterije kot so bakterije iz rodu *Vibrio*, ki lahko spremenijo tip običkanosti (Atsumi in sod., 1996; Kawagishi in sod., 1996; McCarter, 2001). V splošnem bakterije s polarnim bičkom plavajo bistveno počasneje kot bakterije, ki imajo lateralno postavljene bičke (Schneider in Doetsch, 1974; Greenberg in Canale-Parola, 1977; Ferrero in Lee, 1988), zato nekateri vibriji pri povišani viskoznosti

tvorijo peritrihe bičke (Atsumi in sod., 1996). Nekatere peritrihi običkane bakterije pa v bolj viskoznih medijih sintetizirajo še več bičkov na svoji površini (McCarter, 2004).

V splošnem povišana viskoznost zniža hitrost gibanja bakterij (Shoesmith, 1960; Schneider in Doetsch, 1974; Ferrero in Lee, 1988, Shigematsu in sod., 1998), vendar pa se pri viskoznostih v rangu od 1,5 do 3 mPas hitrost gibanja zviša pri mnogih bakterijah (Shoesmith, 1960; Schneider in Doetsch, 1974; Shigematsu in sod., 1998). To se pripisuje boljši učinkovitosti pogjanjanja bička (Schneider in Doetsch, 1974). Večina bakterij doseže maksimalno hitrost gibanja pri viskoznostih med 1 in 8 mPas (Preglednica 1), razlike se pojavijo pri vzdrževanju te hitrosti, saj večina bakterij tega ni sposobna. To ni značilnost le aerobnih bakterij, ampak tudi anaerobnih (Swidsinski in sod., 2007).

Preglednica 1: **Maksimalne hitrosti gibanja različnih bakterij ter viskoznosti, pri katerih se doseže maksimalna hitrost.**

Table 1: Maximal speed of bacterial movement and viscosities at which the maximum is reached.

| Bakterija | Maksimalna hitrost ($\mu\text{m s}^{-1}$) | Viskoznost, pri kateri se doseže maksimalna hitrost (mPas) | Referenca |
|-------------------------------|---|--|--|
| <i>Escherichia coli</i> | 32 | 1,6 do 8 | Greenberg in Canale-Parola (1997) |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | 22 | 1 | Shigematsu in sod. (1998) |
| <i>Serratia marcescens</i> | 42,6 do 44,3 | / | Schneider in Doetsch (1974) |
| <i>Vibrio cholerae</i> | 54 | 1 | Shigematsu in sod. (1998) |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 42 do 73 | 1 do 2 | Shigematsu in sod. (1998) Greenberg in Canale-Parola (1997) |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | 39,3 | 1 | Shigematsu in sod. (1998) |
| | 60 do 100 | 4 do 5 | Ferrero in Lee (1988) |
| <i>Helicobacter pylori</i> | 28,7 | / | Worku in sod. (1999) |
| <i>Spirochaeta halophila</i> | 16 | 2 | Greenberg in Canale-Parola (1997) |

Viskotaksa je obnašanje bakterij analogno kemotaksi. Kemotaktičen odziv je aktivno gibanje proti območju višje koncentracije hranil (Wadhams in Armitage, 2004), medtem ko je viskotaksa gibanje proti območju z višjo viskoznostjo. Bakterija *L. interrogans* se aktivno giblje iz pufra z nizko viskoznostjo v pufer s polivinil pirolidonom (PVP), kar predstavlja pozitivno viskotakso (Petrino in Doetsch, 1978). Podobno se obnašajo tudi spiroplazme. Ravno nasproten pa je odziv bakterije *E. coli*, ki plava stran od medija z višjo viskoznostjo, kar naj bi služilo kot mehanizem prilaganja, ki celicam preprečuje, da bi se ujele v visoko viskoznem matriksu, v katerem se težje premikajo (Sherman in sod., 1982). Sposobnost gibanja bakterij v različno viskoznih okoljih je pomembna tudi za nekatera bolezenska stanja. Če se spremeni viskoznost mukusa v črevesu zaradi antibiotikov, probiotikov ali kortikosteroidov, lahko to neposredno vpliva na permeabilnost mukusa za patogene bakterije in poslabša bolezensko stanje bolnika s sindromom razdraženega črevesa (Turnamian in Binder, 1990; Kunzelmann in Mall, 2002; Swidsinski in sod., 2007).

2.4.2 Fiziološko stanje in metabolna aktivnost

Dokaj malo je znanega o sami fiziologiji celic v okoljih z različno viskoznostjo. S postopnim višanjem viskoznosti medija se niža dovetnost bakterije *Staphylococcus aureus* za antibiotik vankomicin, pri čemer se vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) z naraščajočo viskoznostjo približujejo vrednostim MIK v biofilmih iste bakterije (Kostenko in sod., 2007). Možne razlage za ta pojav so: i) spremembu fiziologije celic, ii) vezava antibiotika na sredstvo za zviševanje viskoznosti (metilceluloza (MC), natrijev alginat, PVP) in iii) spremembu difuzije antibiotika (Kostenko in sod., 2007). Nekateri antibiotiki znotraj bakterijskih biofilmov potujejo počasneje, kar je lahko tudi posledica vezave na polisaharide v matriksu (Walters in sod., 2003), vendar pa prodrejo tudi do najglobljih delov biofilma (Jefferson in sod., 2005). Za to potrebuje na primer vankomicin približno eno uro, medtem ko se v tekočih medijih v cetonih razporedi v manj kot petih minutah (Jefferson in sod., 2005). Poleg spremenjene difuzije antibiotikov, ki so zato na nekaterih mestih prisotni le v subinhibitornih koncentracijah, ima ključno vlogo pri občutljivosti celic še difuzija kisika, hranil in celičnih metabolitov (Walters in sod., 2003; Borriello in sod., 2004). Ti faktorji pomembno vplivajo na fiziološko stanje celic, kar vodi do povišane odpornosti proti antibiotikom različnih bakterij kot so *Pseudomonas aeruginosa* (Walters in sod., 2003; Borriello in sod., 2004; Folsom in sod., 2010), *Klebsiella pneumoniae* (Anderl in sod., 2000), *Staphylococcus aureus* (Jefferson in

sod., 2005) in *Staphylococcus epidermidis* (Chan in sod., 1998; Gilbert in sod., 1998; Wirtanen in sod., 1998; Zheng in Stewart, 2004). Preživetje celic v biofilmu je lahko od 100 do 10000-krat boljše. Če se bakterijski biofilm fizično razbije in se celice resuspendirajo v tekočini, se povrne njihova občutljivost za antibiotike (Walters in sod., 2003; Folsom in sod., 2010).

Fiziološko stanje celic v biofilmih in v plankotnskih kulturah se torej bistveno razlikuje predvsem zaradi spremenjene difuzije, ki je glavni način transporta molekul na mikro in nano skalah (Nelson, 2000). V viskoznih biofilmih se pretok hranil in kisika spremeni, kar vodi do akumulacije metabolitov in nastanka gradientov. Če je koncentracija kisika v tekočini nad biofilmov okrog 6 mg/L, je lahko v notranjih delih bakterijskih biofilmov tudi manj kot 0,2 mg/L (Folsom in sod., 2010). Ti pogoji predstavljajo stres za bakterijske celice, na katerega se morajo prilagoditi (Davey in O'Tolle, 2000; Walters in sod., 2003; Fux in sod., 2005; Resch in sod., 2005; Resch in sod., 2006; Spormann, 2008; Stewart in Franklin, 2008). Prvi in najbolj očiten odziv je znižana hitrost rasti. Medtem ko imajo bakterije v tekočih kulturah hitrost rasti med 0,6 in 0,8 h⁻¹, pa imajo isti bakterijski sevi v biofilmu hitrost rasti med 0,01 in 0,08 h⁻¹ (Anderl in sod., 2003; Walters in sod., 2003; Borriello in sod., 2004; Folsom in sod., 2010). Ker biofilmi kažejo več stadijev razvoja, se med njimi razlikuje tudi hitrost rasti, ki je lahko v začetnih fazah bistveno višja od prej omenjenega povprečja. V prvih šestih urah rasti biofilm bakterije *P. aeruginosa* raste s hitrostjo 0,66 h⁻¹ (Walters in sod., 2003), biofilm bakterije *K. pneumoniae* pa ima v prvih dvanajstih hitrost rasti 0,49 h⁻¹ (Anderl in sod., 2003). Glede na aktivnost sinteze proteinov v biofilmih, ki je najvišja v zgornjih plasteh, se sklepa, da je le del celic v biofilmu aktiven (Folsom in sod., 2010). Aktivnih celic naj bi bilo tako približno 40 odstotkov populacije, razporejene pa so po celiem biofilmu, občasno tudi v najnižjih plasteh (Folsom in sod., 2010). V splošnem velja, da se ob spremembji hitrosti mešanja medija poviša hitrost rasti, metabolizem, prevzem hranil in število celic zaradi boljše raztopljenosti in difuzije kisika ter hranil (Bergstedt in sod., 2004).

Izražanje genov v biofilmih se bistveno razlikuje od izražanja genov v planktonskih celicah (Prigent-Combart in sod., 1999; Resch in sod., 2005; Resch in sod., 2006; Folsom in sod., 2010). Približno 38 % vseh genov se različno izraža v biofilmih bakterije *E. coli*, če primerjamo s tekočo kulturo istega seva (Prigent-Combart in sod., 1999). Posledično se spremeni tudi sinteza proteinov, pri čemer se v zrelih biofilmih bakterije *Streptococcus mutans* od vseh 694 proteinov zniža sinteza 78 proteinov, poviša pa se sinteza 57 proteinov glede na planktonske celice iste bakterije (Svensäter in sod., 2001). Od tega manj izraženi

proteini spadajo v skupino proteinov povezanih s celičnim metabolizmom, povišani pa so proteini za sintezo proteinov, njihovo zvijanje in podvojevanje DNK.

Razlike v fiziologiji med biofilmimi in planktonskimi celicami so najbolje poznane pri medicinsko pomembnih bakterijah, ki jih lahko najdemo v obeh oblikah rasti. Pri bakteriji *P. aeruginosa* je v različnih stopnjah sinteze biofilma metabolizem različen. Proteini vpleteni v metabolizem amino kislin in proteini v ciklu CCK, kot so sukcinat semialdehid dehidrogenaza, fumarat hidrataza, gliceraldehid dehidrogenaza se bolj kot v planktonskih celicah izražajo v biofilmih, še posebno izrazito v zrelih oblikah (Sauer in sod., 2002). Tudi v biofilmu bakterije *S. aureus* se zdi, da je metabolizem na posameznih stopnjah bolj aktiven. Tako je na primer fumarat dehidrogenaza 17-krat bolj izražena v biofilmih, kar pomeni, da ob energiji nastaja tudi bistveno več kisline (Resch in sod., 2005). Proti zakisanju se celice nato borijo s sintezo ureaze, ki ureo razcepi v CO₂ in amoniak. S tem lahko bakterija *S. aureus* poškoduje gostiteljeve celice, medtem ko zadrži pH homeostazo. V biofilmih so zaznali tudi povišanje izražanje genov *gluA*, *gudB* in *glmS* kot tudi genov, ki kodirajo proteine aktivne v CCK (npr. *sdhCAB*), kar nakazuje, da je nivo glikolize in fermentacije povišan. Poleg tega je povišano tudi izražanje petih proteinov poti pentoze fosfata, ki celicam zagotavlja redukcijsko moč ter sladkorje z različnim številom ogljikovih atomov za biosintezo (Resch in sod., 2006). Intenzivnejša je tudi sinteza kompleksnih amino kislin, saj se tRNK sintaze za arginin, tirozin, triptofan, fenilalanin in cistein bolj izražajo. S časom se izražanje genov zmanjša, tudi izrazito povišani geni se malce utišajo, kar je verjetno posledica pomanjkanja kisika in hranil (Resch in sod., 2005). Proti stresu se bakterije odzovejo z aktivacijo t.i. stresnih genov, kot so *rpoS*, protein za alkalni šok, geni za detoksifikacijo reaktivnih zvrsti kisika (katalaza, peroksidaza, superoksid dismutaza). Zanimivo je, da je razen stafilokantina v biofilmih znižana sinteza toksinov (Resch in sod., 2005).

V živilski mikrobiologiji pomembne glive iz rodu *Aspergillus* so odvisne od mikrostrukture hrane oziroma viskoznosti površin, na katerih se nahajajo. Podobno kot pri bakterijah tudi za glivo *A. carbonarius* višja viskoznost pomeni znižano hitrost rasti in spremenjen sekundarni metabolizem, predvsem zaradi razlik v distribuciji kisika in hranil (Kapetanakou in sod., 2011). Viskoznost do 18 mPas sama ali v kombinaciji z neoptimalno slanostjo ali temperaturo rasti povzroči znižano hitrost rasti, omejeno sintezo ohratoksin, ki je toksičen in potencialno rakotvoren sekundarni metabolit glive *A. carbonarius* (Kapetanakou in sod., 2011). Podoben odziv na nivoju rasti in sekundarnega metabolizma so opisali tudi pri glivah *Aspergillus flavus* in *Aspergillus niger* (Huang in sod., 2009) ter

pri bakterijah *Listeria innocua*, *Lactococcus lactis* in *Salmonella typhimurium* (Antwi in sod., 2007; Theys in sod., 2008).

2.4.3 Medcelična komunikacija

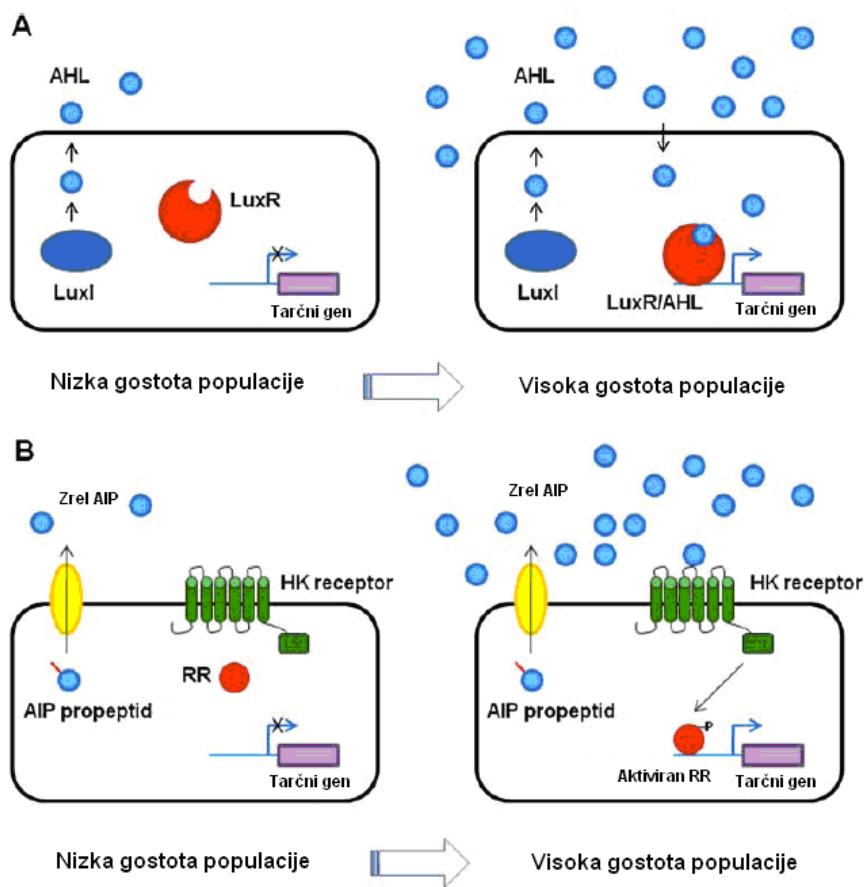
Proučevanje bakterijske komunikacije je eno od najhitreje razvijajočih se področij v mikrobiologiji. Zaznavanje celične gostote (angl. quorum sensing) (Fuqua in sod., 1994) je mehanizem, s katerim bakterije kolektivno kontrolirajo izražanje genov za koordiniranje aktivnosti, ki so učinkovite za celotno populacijo (Schauder in Bassler, 2001). Bistveni deli sistema za zaznavanje celične gostote so encim za sintezo signala, signalna molekula, receptor za signalno molekulo in regulator odziva, ki uravnava izražanje genov. Slednji je lahko tudi odsoten (Subramoni in Venturi, 2009).

Signali so majhne molekule, katerih transport poteka z difuzijo, in jih celice sočasno izločajo, kot tudi zaznavajo. Zato jim pogosto rečemo avtoinduktorji. Ker celice proizvajajo mnogo metabolitov, ki so jih sposobne zaznati, je pomembno, da definiramo vlogo signala pri medcelični komunikaciji. Kriteriji, da je molekula dejansko signal, so (Winzer in sod., 2002):

- produkcija signalne molekule se dogaja med točno določeno fazo rasti, pod določenimi fiziološkimi pogoji ali med odzivom na spremembe v okolju;
- signalne molekule se kopičijo izven celic in jih prepozna specifični receptor;
- akumulacija signalnih molekul povzroči odziv, ko je dosežena kritična koncentracija teh molekul;
- celični odziv je večji kot bi bil le fiziološki odziv pri presnovi ali detoksifikaciji te molekule.

Poznamo več tipov signalnih molekul. Mnoge po Gramu pozitivne bakterije uporabljajo kratke peptide (Dunny in Leonard, 1997; Novick in Muir, 1999), medtem ko so signali po Gramu negativnih bakterij zelo raznoliki (Fuqua in Winans, 1994; Fuqua in sod., 1996; Fuqua in Greenberg, 1998; Bassler, 1999; Pesci in sod., 1999). Med njimi so najbolje poznani acil homoserin laktoni (AHL), za katere se uporablja tudi oznaka avtoinduktor 1 (AI-1). Poleg omenjenih obstaja še univerzalna signalna molekula avtoinduktor-2 (AI-2), ki se pojavlja tako pri po Gramu pozitivnih kot tudi pri po Gramu negativnih bakterijah (Federle in Bassler, 2003; Kaper in Sperandio, 2005). Funkcija molekule AI-2 je posredovanje pri komunikaciji med istimi kot tudi različnimi vrstami bakterij.

Mehanizem delovanja sistema za zaznavanje celične gostote, ki je odvisen od acil homoserin laktonov (AHL), je shematsko predstavljen na sliki 4A. AHL signale proizvaja LuxI družina sintaz. Pri nizki gostoti populacije je koncentracija AHL molekul nizka, zato jih nestabilni receptor za AHL LuxR hitro razgradi. Ko se koncentracija AHL poviša do mejne vrednosti, se AHL molekule vežejo na receptor LuxR, s čemer ga aktivirajo. Aktivirani kompleks nato modelira prepisovanje tarčnih genov. Na sliki 4B je predstavljen drugi tip sistema za zaznavanje celične gostote, ki temelji na zaznavanju avtoinduktorskih peptidov. Le-ti so sintetizirani kot propeptidi, ki se morajo posttranslacijsko modificirati pred izločanjem v okolje preko specializiranih transporterjev (Choudhary in Schmidt-Danner, 2010). Pri visoki gostoti celic je zrelih peptidov veliko, zato se vežejo in hkrati aktivirajo transmembranske receptorske histidin kinaze, ki aktivirajo regulator odziva (RR). Aktivirani regulator odziva usmerja prepisovanje tarčnih genov.



Slika 4: Shema bakterijskih sistemov za zaznavanje celične gostote (Choudhary in Schmidt-Danner, 2010). A: sistem za zaznavanje kvoruma preko acil homoserin laktonov (AHL) in B: sistem za zaznavanje kvoruma preko avtoinducerskih peptidov (AIP).

Figure 4: **Schematic representation of bacterial quorum sensing systems (Choudhary and Schmidt-Dannert, 2010).** A: quorum sensing of acyl homoserine lactones and B: quorum sensing of autoinducing proteins (AIP).

Bakterije s sistemom za zaznavanje celične gostote kontrolirajo tvorbo biofilmov, izločanje virulenčnih dejavnikov, sporulacijo, kompetenco, bioluminiscenco, nodulacijo, sposobnost gibanja, izločanje antibiotikov, encimov za preprečevanje aktivnosti antibiotikov in odpornost na kisli ali oksidativni stres (Rudner in sod., 1991; Perego in Hoch, 1996; Davies in sod., 1998; Parsek in Greenberg, 2000; Miller in Bassler, 2001; Takano in sod., 2001; Shrout in sod., 2001; Miller in sod., 2002; Hammer in Bassler, 2003; Zhu in Mekalanos, 2003; Wen in Burne, 2004; Bassler in Losick, 2006; Sakuragi in Kolter, 2007; Williams in sod., 2007; Sztajer in sod., 2008). Mnoge patogene ali simbiotske interakcije bakterij z rastlinami ali živalmi so odvisne od medcelične komunikacije. Pogostost sistemov za medcelično komuniciranje nakazuje, da so se ti sistemi razvili v zgodnji fazi bakterijske evolucije (Lerat in Moran, 2004).

Aktivacija izražanja genov, ki so kontrolirani s QS sistemom, je odvisna od lokalne koncentracije signalnih molekul v lokalnem okolju bakterijskih celic (Redfield, 2002; Hense in sod., 2007; Horswill in sod., 2007), le-ta pa je odvisna od hitrosti sinteze, življenske dobe (hitrost razgradnje) in hidrodinamike (tok tekočine) (Hense in sod., 2007). Na akumulacijo signalov znatno vpliva difuzija signalnih molekul, saj se lahko pri veliki difuziji večina signala odstrani iz mikrookolja celic, ki jih proizvajajo. Nedavno so pokazali, da koncentracija signalnih molekul pada z naraščanjem razdalje od signal producirajoče celice (Slika 5) (Alberghini in sod., 2009). Difuzija signalov se zniža zaradi povišane viskoznosti, ko je to prikazano v Stokes-Einstenovi enačbi (2).

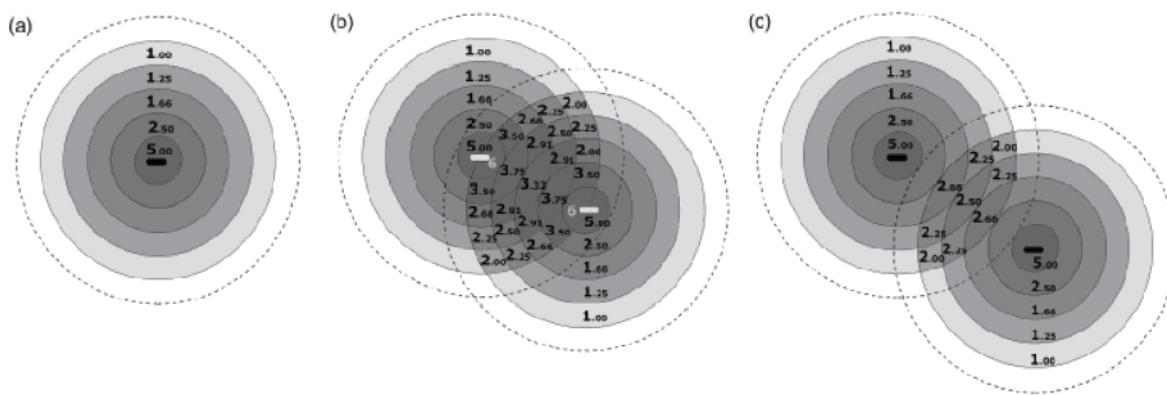
$$D = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad \dots (2),$$

pri čemer je D difuzijska konstanta, k_B je Boltzmanova konstanta, T je temperatura, η je viskoznost, r pa je radij oddaljenosti od celice.

Difuzijski koeficient D v vodi pri 25°C je za dve različni molekuli AHL (N-3-oksoodekanoil-1-homoserin lakton in N-butiril-homoserin lakton) $4,9 \times 10^{-6}$ oziroma $7,2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (Stewart, 2003). Ker je D odvisna od temperature in viskoznosti jo je za temperature nižje od 25°C in viskoznosti višje od viskoznosti vode potrebno ustrezno prilagoditi. Stewart (1998) predlaga, da se pri temperaturi 5°C uporabi faktor 0,5 za

konverzijo D_T/D_{25} , za zvišanje viskoznosti v biofilmu pa 0,2 (D_e/D_{aq}). Difuzijska konstanta za N-butiril-homoserin lakton potem postane $4,9 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Če se difuzija zmanjša za 10-krat ali celo 100-krat, si lahko celice privoščijo 10-krat ali 100-krat zmanjšano hitrost sinteze signalnih molekul, pa bodo vseeno dosegle nivo koncentracije pri nezmanjšani difuziji (Alberghini in sod., 2009). Na podlagi tega lahko sklepamo, da je ob povišanju viskoznosti gradient koncentracije signalnih molekul okoli celice še bolj izrazit. Zato lahko celice prej dosežejo potrebno koncentracijo signalov in aktivirajo QS. Tako lahko že samo dve celici dosežeta t.i. kvorum in posledično indukcijo genov reguliranih s celično komunikacijo (Dulla in Lindow, 2008). Bakterija *Pseudomonas syringae* to doseže na površini listov rastlin, vendar le v primeru, da so listi posušeni (imajo bistveno znižano vsebnost vode). Če je prisotno vsaj nekaj tekočine, se difuzija poveča, kar odnese signale stran od producentske celice (Dulla in Lindow, 2008). Za indukcijo reguliranih genov na mokrih listih je posledično potrebno več časa kot na suhih listih (Dulla in Lindow, 2008). Tudi na koreninah rastlin lahko pride do podobne situacije kot na listih, saj lahko že dve bakterijski celici med seboj učinkovito komunicirata (Gantner in sod., 2006).

Pri medcelični komunikaciji so pomembni še velikost sistema, gostota celic in njihova pozicija (Hense in sod., 2007; Alberghini in sod., 2009). Koncentracija signalnih molekul recipročno pada s povečevanjem razdalje od točke produkcije (Alberghini in sod., 2009). Tako se koncentracija pri $r=2$ zmanjša na $\frac{1}{2}$, pri $r=3$ na $\frac{1}{3}$ in pri $r=4$ na $\frac{1}{4}$ začetne koncentracije (Alberghini in sod., 2009). Na ta način se okoli celice ustvari gradient koncentracije signalnih molekul, kot je prikazano na sliki 5a. V primeru, da je v sistemu več celic, na primer dve, sta celici lahko na razdalji, pri kateri se njuna gradienata ne prekrivata in je zato maksimalna koncentracija signala za celico tudi maksimum, ki ga le-ta lahko proizvede. Če pa sta dve celici na dovolj majhni razdalji, se njuna gradienata prekrivata, s tem pa se povečujejo tudi lokalne koncentracije signalnih molekul (slika 5b in 5c). Bolj kot sta celici bližje, višje so koncentracije signalnih molekul. Ob povišanju le-te, se potem izražanje genov uravnanih s sistemom za zaznavanje celične gostote lahko začne prej (Alberghini in sod., 2009). Pozicija bakterijskih celic v viskoznih medijih je odvisna od njihove sposobnosti gibanja (Poglavlje 2.3.1).



Slika 5: **Gradienti koncentracije signalnih molekul okoli producentske celice.** a) posamezna celica, b) celici, katerih gradienta se prekriva in koncentracija preseže kritično vrednost, zato se spremeni izražanje genov, c) celici, katerih gradienta sta v kontaktu, a koncentracija signalnih molekul ne preseže kritične vrednosti (Alberghini in sod., 2009).

Figure 5: **Signal molecule concentration gradient around producing cells.** A) individual cell, b) cells that have overlapping gradients and the concentration of signal molecules exceeds threshold, c) cells that are in contact, but the signal molecule concentration does not exceed the threshold concentration (Alberghini et al., 2009).

Zaradi vseh omenjenih dejavnikov, ki se lahko neodvisno spreminja, kaže, da je komunikacija med bakterijami ključno odvisna od fizikalnih značilnosti okolja. Med temi sta zagotovo izredno pomembni temperatura in viskoznost, ki narekujeta, kakšna bo difuzija molekul in gibanje celic. Zato ne čudi, da se nekateri ne strinjajo z izrazom »zaznavanje celične gostote«, saj naj bi bilo bistveno zaznavanje difuzije oziroma relativne pozicije. Dvome o namenu sistema za zaznavanje celične gostote (Velicer in sod., 2000; Miller in Bassler, 2001; Redfield, 2002) naj bi rešili trije do sedaj predlagani koncepti. To so:

- **zaznavanje pozicije celice v mikrookolju** (Alberghini in sod., 2009)
- **zaznavanje difuzije signala v okolini celice** (angl. diffusion sensing (Redfield, 2002)): Bakterije izločajo sideroforje, antibiotike, surfaktante in druge sekundarne metabolite, ki zagotovijo prednost posamezni celici, ampak bo uspešna šele, če bosta difuzija in mešanje omejena. V tem primeru bodo izločene molekule ostale v bližini celice, ki bo lahko od njih tudi imela koristi. Difuzija in tok tekočine v naravnih okoljih sta lahko nepredvidljiva dejavnika, zato celice producirajo in izločajo avtoinduktorje, s katerimi lahko ocenijo spremembe v fizikalnih lastnostih okolja in se nanje ustrezno prilagodijo. Nenazadnje, imajo tako producentske celice kot tudi celice, ki signal zaznavajo od komunikacije korist, kar lahko pojasni zakaj

je sistem za komunikacijo tako razširjen v mikrobnem svetu (Redfield, 2002; Gantner in sod., 2006).

- **zaznavanje učinkovitosti** (angl. efficiency sensing (Hense in sod., 2007): celice zaznavajo njihovo gostoto, fizikalne značilnosti okolja (difuzijo oziroma tok tekočine) ter razporeditev v okolju. Zato producirajo in izločajo difuzivne avtoinduktorske molekule, s katerimi testirajo ali se splača proizvajati energijsko dražje difuzibilne efektorske molekule. Da je položaj bakterij res pomemben, je pokazano na sliki 5. Če so bakterije v bližnjem kontaktu, se lahko prej ustvari dovolj visoka koncentracija signalnih molekul, kot če so bakterije na daljši razdalji (Alberghini in sod., 2009). Po teoriji zaznavanja učinkovitosti je učinkovitost enaka 0 %, če se testne molekule izgubijo zaradi toka tekočine, prevelike oddaljenosti celic ali njihove prenizke gostote. Ob ravno obratni situaciji (če se vsi signali ohranijo), je učinkovitost 100 %. Tudi evolucijsko ta teorija združuje koncepta zaznavanja celične gostote in zaznavanja difuzije, saj zagotavlja prednosti tako za posamezne celice, kot tudi skupine (Hense in sod., 2007).

Kljub temu, da glede mikrobne komunikacije obstajajo številna vprašanja, je dejstvo, da je znanje o teh procesih omogočilo tudi napredek v biotehnologiji. Medcelično komunikacijo se izkorišča pri produkciji bioloških spojin, tkivnem inženiringu, mešanih fermentacijah, diagnostiki in terapiji patogenov, biokontroli, zaznavanju raka ter preprečevanju tvorb biofilmov na kirurških vsadkih, bioreaktorjih, ceveh in drugih transportnih sistemih (Choudhary in Schmidt-Dannert, 2010).

2.4.4 Bakterijski medvrstni odnosi

Bakterije se v svojih naravnih okoljih le redko nahajajo v čistih kulturah. Največkrat so v mešanih kulturah, v katerih poteka več procesov, kot so sintrofija, komunikacija in tekmovanje. Ti procesi so namenjeni zagotavljanju optimalnega delovanja in prilagajanja mikrobnih združb (Jacobovics, 2010). V splošnem se tip odnosa med organizmi definira glede na fitnes posameznega organizma v prisotnosti drugega (West in sod., 2006). Tako poznamo štiri glavne tipe odnosov, ki so predstavljeni v preglednici 2. Mutualizem ali sožitje je odnos med dvema bakterijskima sevoma, od katerega imata oba korist oziroma pozitiven fitnes. V primeru, da ima le prejemnik pozitiven fitnes, je odnos bodisi parazitski bodisi altruističen. Altruizem je oblika socialnega stika, ki je v naravi težko razložljiv. Najpogosteje se pojavlja pri dveh sorodnih organizmih, domnevno zaradi teorije o izboru v

korist sorodstva (angl. kin selection (Foster in sod., 2005)). Ravno nasproten altruizmu je amenzalizem, ki je odnos, pri katerem aktivni udeležec z izločanjem protibakterijske snovi zavira rast ali razvoj drugega udeženca. Tak odnos je v naravi pogost (Foster in Bell, 2012), saj je sinteza protibakterijskih snovi široko razširjena med organizmi. Odnosu, v katerem imata oba seva negativen fitnes, rečemo kljubovalnost (angl. spite), vendar pa je ta pojav izredno redek v naravi, saj se nihče od udeležencev ne more razmnožiti in zavzeti določene ekološke niše (Foster in sod., 2001).

Preglednica 2: **Tipi bakterijskih medvrstnih odnosov na podlagi fitnesa udeležencev (West in sod., 2006).**

Table 2: **Types of bacterial interspecies interactions on the basis of participants fitness (West et al., 2006).**

| Tip odnosa | Fitnes aktivnega udeleženca | Fitnes prejemnika |
|--------------------------|-----------------------------|-------------------|
| Mutualizem | pozitiven | pozitiven |
| Altruizem in parazitizem | negativen | pozitiven |
| Amenzializem | pozitiven | negativen |
| Kljubovalnost | negativen | negativen |

Predvsem zaradi zanimanja za biofilme so se študije obnašanja mikroorganizmov v mešanih kulturah v zadnjem desetletju močno razširile. Viskoznost oziroma gostota populacije naj bi imela ključno vlogo pri evoluciji medceličnosti, interspecifičnem mutualizmu in mikrobnih kooperacijih (Kümmerli in sod., 2009), zato ne čudi, da se raziskave v zadnjem času posvečajo tudi vplivom viskoznosti okolja. Interakcije med bakterijskimi sevi so odvisne od viskoznosti, saj ne-viskozno okolje dovoljuje tekmovanje vseh prisotnih sevov, med tem ko viskozno okolje dovoljuje le lokalne kompeticije med sevi, ki so prisotni na istem lokalnem območju ob istem času (Czaran in sod., 2002; Le Gac in Doebeli, 2010). Poleg tega viskoznost spreminja difuzijo molekul in gibanje bakterijskih celic.

Bakterijski biofilm je oblika zelo viskoznega okolja, za katerega se predvideva, da je najbolj razširjena oblika bakterijskih kultur v okolju. Medtem ko so nekateri biofilmi sestavljeni samo iz ene vrste, so nekateri sestavljeni in več vrst. Odnosi med vrstami so tako sožitje, kot tudi tekmovanje (Moons in sod., 2009; Jakubovics, 2010). Te interakcije vplivajo na strukturo, fiziologijo in razvoj biofilma (Jones in sod., 1995). Metabolno sodelovanje in antagonizem sta mehanizma, s katerima se prilagaja fitnes določenih sevov znotraj zrelega biofilma (Moons in sod., 2009; Jakubovics, 2010). Ko se pogoji v okolju

spremenijo zaradi aktivnosti samih bakterij ali zaradi okoljskih sprememb, je tekmovanje pomemben mehanizem za vzdrževanje stabilne mikrobne združbe (Jakubovics, 2010).

Med mikroorganizmi se je razvilo medsebojno tekmovanje za hranila in zavzemanje ekoloških niš. Antibiotiki, najbolj široko uporabljano zdravilo na svetu, so bili odkriti kot produkti mikrobov, ki so ustavili rast ali ubili celice druge vrste. Čeprav so namenjeni neposrednemu tekmovanju za ekološke niše, pa nekateri zagovarjajo tudi možnost, da so antibiotiki namenjeni medceličnemu signaliziranju, s katerim lahko mikrobne združbe prilagajajo njihovo sestavo in aktivnost (Linares in sod., 2006; Yim in sod., 2007; Fajardo in Martinez, 2008). V splošnem imajo antibiotiki pet mehanizmov delovanja, i) inhibicija sinteze celične stene, ii) inhibicija sinteze proteinov in iii) inhibicija sinteze DNK, iv) inhibicija sinteze RNK ter v) vpletanje v metabolizem. Tudi prodigiozinu podoben rdeči pigment bakterije *V. ruber* deluje protimikrobnno (Starič in sod., 2010), vendar pa mehanizem delovanja še ni poznan. Posebna skupina naravnih antibiotikov so bakteriocini, proteinske molekule, ki jih proizvajajo različne vrste bakterij, po katerih se največkrat bakteriocini poimenujejo. Najbolj poznani so kolicini (bakteriocini bakterije *E. coli*), vibriocini (bakteriocini bakterij iz rodu *Vibrio*), subtilizin bakterije *Bacillus subtilis*, piocin bakterije *P. aeruginosa*, mutacin bakterije *Streptococcus mutans* in nizin bakterije *Lactococcus lactis* (Riley in Chavan, 2007). Imajo več možnih mehanizmov delovanja, kot so i) tvorba pore, ii) razgradnja DNK, iii) nukleazna aktivnost in podobno.

2.4.4.1 Javno dobro

Kooperacija je obnašanje bakterij, s katerim preprečujejo mutantam, da bi izkoriščale divji tip, ki je na primer sposoben sinteze kolicinov ali sideroforjev (Kümmerli in sod., 2009; Le Gac in Doebeli, 2010). Raziskave na bakteriji *P. aeruginosa* so pokazale, da viskoznost okolja favorizira producente javnih dobrin (sideroforjev), ko je gibljivost in difuzija omejena. Relativni fitnes mutant, ki ne proizvajajo sideroforjev, vendar pa imajo korist od njih, pada z višanjem viskoznosti ne glede na čas kompeticije ali začetnega števila celic (Kümmerli in sod., 2009). Kljub temu pa tudi pri najvišji viskoznosti imajo mutante še vedno višji fitnes kot v monokulturi, kar nakazuje, da difuzija sideroforjev ni popolnoma omejena. Podobno so pokazali tudi za kolicine, ki jih proizvaja bakterija *E. coli* (Le Gac in Doebeli, 2010), saj se ne glede na viskoznost v vsakem primeru razvijejo mutantski sevi, ki ne sintetizirajo kolicinov. Razlika je le v hitrosti evolucije – v neviskoznem okolju se mutante razvijejo hitreje. Relativni fitnes kolicin producirajočih in mutant ni odvisen od

viskoznosti (Le Gac in Doebeli, 2010). Razlike v rezultatih raziskav na bakterijah *E. coli* in *P. aeruginosa* so lahko posledica dejstva, da je evolucija odvisna od molekularnih značilnosti molekul, ki so javna dobrina (Kümmerli in Brown, 2010).

2.5 OPIS PROUČEVANIH BAKTERIJ

2.5.1 Bakterija *Vibrio ruber*

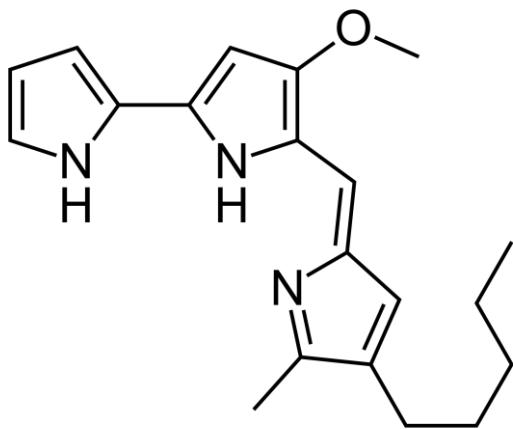
Bakterija *Vibrio ruber* (pred poimenovanjem označena kot *Vibrio* sp. DSM14379) je bila izolirana iz brakičnih voda Škocjanskega zatoka in kot vsi vibriji spada v deblo *Proteobacteria*, razred γ *Proteobacteria* in družino *Vibrionaceae*. Je po Gramu negativna bakterija z obliko ukrivljene palčke in ne tvori spor. Njen metabolizem je fakultativno anaeroben. Ima široko območje halotolerantnosti – od 0,5 do 17 % (w/V) NaCl, najbolje pa deluje pri 3 % (w/V) NaCl (Danevčič, 2006). V svojem genomu ima zapis za več profagov. Ob indukciji profaga z mitomicinom C se sproščajo morfološko različni bakteriofagom podobni delci (Gnezda-Meijer in sod., 2006). Bakterija *V. ruber* proizvaja zunajcelične polisaharide (Stopar in sod., 2002) in rdeče obarvan pigment soroden prodigiozinu (Štraser, 2008). Njegova sinteza je pod kontrolo mehanizma za zaznavanje celične gostote, nanjo pa vplivajo tudi različni dejavniki okolja (Starčič in sod., 2010).

2.5.1.1 Prodigiozin

Prodigiozin (4-metoksi-5-[(Z)-(5-metil-4-pentil-2H-pirol-2-iliden)metil]-1H,1'H-2,2'-bipirol) je rdeči pigment, ki ga proizvaja veliko različnih bakterij iz rodu *Serratia*, *Actinomycetes* (*Streptomyces coelicolor*) ter morske bakterije (*Hahella chejuensis*, *Pseudoalteromonas denitrificans*) (Williamson in sod., 2006). Je sekundarni metabolit, ki ga producirajo tudi bakterije iz rodu *Vibrio*, na primer *Vibrio gazogenes* (Allen in sod., 1983), *Vibrio psychroerythrus* (Aoust in Gerber, 1974), *Vibrio rhizosphaerae* (Kumar in Nair, 2007), *Vibrio ruber* (Shieh in sod., 2003) in *Vibrio* sp. KSJ45 (Alihosseini in sod., 2008).

Molekula prodigiozina je po strukturi piril dipiril meten s kemijsko formulo C₂₀H₂₅N₃O. Sestavlja jo trije pirolni obroči, med katerimi sta dva direktno povezana, tretji pa je pripet z metenskim mostičkom (Gerber, 1975) (Slika 6). Prekurzorji v biosintezi prodigiozina so

prolin, serin, alanin (Quadri in Williams, 1971; Bennett in Bentley, 2000), glicin in ocetna kislina (Hubbard in Rimington, 1950). Pri bakteriji *Serratia marcescens* poteka biosinteza preko razcepljene poti, ki se konča z encimsko kondenzacijo končnih produktov, 2-metil-3-n-amilil-pirola (Williamson in sod., 2006) in 4-metoksi-2,2'-bipirol-karbaldehida (Morrison, 1966; Goldschmidt in Williams, 1968). Sinteza je regulirana preko mehanizmov odgovora na stradanje (ang. stringent response) in zaznavanje celične gostote (Thomson in sod., 2000; Coulthurst in sod., 2004; Williamson in sod., 2006; Danevčič in Stopar, 2009).



Slika 6: Kemijska struktura prodigiozina (Williamson in sod., 2006).

Figure 6: Chemical structure of prodigiosin (Williamson et al., 2006).

Prodigiosin je hidrofoben (Purkayastha in Williams, 1960; Williams in Quadri, 1980; Williamson in sod., 2006), zato se lahko vgradi v celične membrane (Purkayatsha in Williams, 1960; Wei in Chen, 2005; Meschke in sod., 2011; Ryazantseva in sod., 2012), najden pa je bil tudi v inkluzijah znotraj celic (Meschke in sod., 2011; Haddix in sod., 2008; Williamson in sod., 2005). Nekaj pigmenta se lahko nahaja tudi v bližini celic v zunajceličnem prostoru (Williamson in sod., 2005; Meschke in sod., 2011). Čeprav je natančna ekofiziološka vloga prodigiozina še predmet debate (Burger in Bennet, 1985; Hood in sod., 1992; Ryazantseva in sod., 1995; Seganish in Davis, 2005; Williamson in sod., 2006; Haddix in sod., 2008; Starič in sod., 2010; Borić in sod., 2011), pa je njegovo protimikroben delovanje nespororno. Prodigiosin in njemu sorodne molekule inhibirajo rast več različnih vrst bakterij, od po Gramu pozitivnih do negativnih, kot tudi morskih in bakterij v tleh (Gerber, 1975; Boger in Patel, 1987; Williamson in sod., 2006; Starič in sod., 2010; Lee in sod., 2011; Samrot in sod., 2011). Poleg tega ima še protiglivne (Castro in sod., 1967; Gerber, 1971) in protiparazitske aktivnosti (Castro, 1967; Azambuja in sod.,

2004). Dobro poznana značilnost prodigiozina je tudi protirakavo in imunosupresivno delovanje (Pérez-Tomás in sod., 2003; Williamson in sod., 2006). Najbolj zanimiva lastnost z velikim biotehnološkim potencialom, je sposobnost indukcije programirane celične smrti rakavih celic z minimalnim vplivom na normalne celice (Yamamoto in sod., 1999). Poleg te so bili opisani še sledeči vplivi na evkariontske celice (Ohkuma in sod., 1998; Seganish in Davis, 2005; Williamson in sod., 2006; Regourd in sod., 2007; Pandey in sod., 2009):

- razklapljanje lizosomskih ali vakuolnih ATP sintaz s prekomernim H^+/Cl^- simportom,
- oksidativna razgradnja DNK zaradi interkalacije,
- DNK fragmentacija, kot posledica stabilizacije kompleksom topoizomeraze in DNK,
- zaustavitev celičnega cikla,
- aktivacija kaspaz in
- vpletanje v signalne poti.

2.5.2 Bakterija *Vibrio harveyi*

Bakterija *Vibrio harveyi* je po Gramu negativna, rahlo ukrivljena paličasta bakterija, ki je sposobna aktivnega plavanja s pomočjo enega, polarno nameščenega bička. Njen metabolizem je fakultativno anaeroben, kar pomeni, da lahko ATP pridobiva tudi s fermentacijo. Taksonomsko spada v deblo *Proteobacteria*, razred *Gammaproteales* in red *Vibrionales* (Garrity in sod., 2004). Nahaja se v morski vodi in je pogost patogen številnih morskih organizmov, kot so rible, morski psi, morski konjički, rakci in jastogi (Diggles, 2000). Bolezenska stanja, ki lahko vodijo tudi v smrt organizma, povzročijo virulenčni dejavniki, katerih izražanje je pod kontrolo sistema za zaznavanje celične gostote (angl. quorum sensing). Da bakterije med seboj komunicirajo je bilo pokazano prav pri tej bakteriji (Bassler in sod., 1997). Tako regulirani procesi so poleg virulence še sinteza antibiotikov, tvorba biofilma, simbioza, gibljivost in biolumiscanca. Slednja je značilna za še enega predstavnika rodu *Vibrio*, *V. fischeri*, simbionta morskih organizmov kot je havajski ligenj (McFall-Ngai, 1994; Dunlap, 1999). Bioluminiscanca je rezultat oksidacije organske snovi z encimom luciferaza, pri čemer je sprosti prosti energija v obliki svetlobe (Showalter in Silverman, 1990). Poleg komunikacije med celicami iste vrste, je bakterija *V. harveyi* sposobna komunikacije tudi z drugimi vrstami, za katero naj bi bila odgovorna molekula AI-2 (Henke in Bassler, 2004). Ker bakterija *V. harveyi* ni patogena za človeka,

je tako postala pomemben modelni organizem za raziskovanje bakterijske medcelične komunikacije, bioluminiscence in virulence.

2.5.3 Bakterija *Escherichia coli*

Bakterija *Escherichia coli* je od odkritja v letu 1885 postala modelni organizem za mnoge procese, kot tudi biotehnološko orodje za pridobivanje spojin za zdravila (Lee, 1996). Razvrščena je v deblo *Proteobacteria*, razred *Gammaproteobacteria* in red *Enterobacteriales* (Garrity in sod., 2004). Spada med po Gramu negativne paličaste bakterije, ki ne morejo tvoriti spor. Metabolno je fakultativni anaerob, ki mu izjemno prilagodljivost na okolje omogočajo procesi horizontalnega prenosa genov transdukcija in konjugacija. Načeloma ima en, krožni kromosom, ki kodira približno 4000 genov (Reed, 2005). Pogosto imajo sevi tudi enega ali več plazmidov. Bakterijo *E. coli* najdemo v spodnjih prebavilih človeka in drugih, toplokrvnih sesalcev. V človeškem debelem črevesu pomaga pri procesu prebave, razgradnji hrane, absorpciji hranil ter sintezi vitamina K (Bentley in Meganathan, 1982; Hudault in sod., 2001; Reid in sod., 2001). Čeprav je komenzalna bakterija, pa lahko povzroča tudi številne bolezni. Le-te so odvisne od posameznega seva in virulenčnih dejavnikov, ki jih sintetizira. Na podlagi serotipov so črevesne bakterije *E. coli* razdeljene v 6 kategorij, enterotoksigene *E. coli* (ETEC), enteropatogene *E. coli* (EPEC), enteroinvazivne *E. coli* (EIEC), enterohemoragične *E. coli* (EHEC), enteroadherentne aggregativne *E. coli* (EAggEC) ter verotoksigene *E. coli* (VTEC) (Parry in Palmers, 2002). Omenjene bakterije lahko povzročajo črevesne in izvenčrevesne okužbe, med katerimi je verjetno najbolj pogosta infekcija urinarnega trakta. Poleg medicinskega pomena ima bakterija *E. coli* tudi biotehnološko vrednost zaradi enostavnega gojenja in manipuliranja genov (Lee, 1996). Zaradi nahajanja v črevesju človeka jo uporabljamo tudi kot indikator fekalne kontaminacije voda.

2.5.4 Bakterija *Bacillus subtilis*

Bakterija *Bacillus subtilis* taksonomsko spada v deblo *Firmicutes*, razred *Bacilli* in red *Bacillales* (Garrity in sod., 2004). To po Gramu pozitivno paličasto bakterijo najpogosteje najdemo v tleh. Stres in pomanjkanje hranil sta pogosta v takem okolju, zato imajo celice več mehanizmov za preživetje (Bandow in sod., 2002; Schaechter in sod., 2006). To so sporulacija, prevzem zunanje DNK ali kompetenca ter odziv na stres preko σ^B globalnega regulatorja. Spore so odporne na vročino, UV sevanje, vlago, sušenje, zaradi postopka

njihove tvorbe pa je bakterija *B. subtilis* postala modelni organizem za študij celičnega razvoja in diferenciacije. Gibljivost celic omogočajo pili, pri čemer največkrat opazimo »swarming«. Za to je pomembna tudi spojina surfaktin, ki zmanjšuje trenje med celicami in površino (Schaechter in sod., 2006). Sprva je veljalo, da je bakterija *B. subtilis* aerobna, vendar pa so pozneje ugotovili, da je sposobna proizvajati ATP v anaerobnih pogojih s fermentacijo butandiola in nitratno amonifikacijo. To se ujema s poročanjem, da se bakterija *B. subtilis* nahaja v prebavilih sesalcev (Hong in sod., 2009). V enem kromosomu, ki ga imajo celice, je veliko genov namenjeno metabolizmu in sintezi antibiotikov. Med slednjimi so polimiksin, dificidin, subtili in mikobacilin, zato se bakterija *B. subtilis* tudi biotehnološko uporablja (Stein, 2005). Še pomembnejšo biotehnološko vrednost pa ima sinteza encimov za razgradnjo polimerov – proteinov, škroba, pektina, celuloze (Morikawa, 2006). Nenazadnje lahko bakterijo *B. subtilis* uporabljamo tudi pri zaščiti rastlin, saj s tvorbo biofilmov preprečujejo okužbo z različnimi rastlinskimi patogeni. V zameno rastlina zagotovi hranila in s tem ekološko nišo (Bais in sod., 2004; Holzinger in sod., 2011; Chen in sod., 2013).

3 MATERIAL IN METODE DELA

3.1 MATERIAL

3.1.1 Kemikalije

- 1,3,5-trifeniltetrazolijev formazan (TTF) $M_w = 303,37$ (Fluka, Švica)
- 1,4-ditio-DL-treitol $C_4H_{10}O_2S_2$ (DTT) $M_w = 154,25$ (Fluka, Švica)
- 2,3,5-trifeniltetrazolijev klorid (TTC) $C_{19}H_{15}ClN_4$ $M_w = 334,81$ (Merck, Nemčija)
- 2-propanol C_3H_8O $M_w = 60,1$ (Merck, Nemčija)
- 96 % (V/V) etanol C_2H_5OH $M_w = 46,07$ (Merck, Nemčija)
- aceton C_3H_6O $M_w = 58,08$ g/mol (Merck, Nemčija)
- adenozin-5'-difosfat dinatrijeva sol (ADP) $C_{10}H_{13}N_5Na_2O_{10}P_2$ $M_w = 471,17$ (Fluka, Švica)
- adenozin-5'-trifosfat dinatrijeva sol hidrat (ATP) $C_{10}H_{14}N_5Na_2O_{13}P_3 \cdot H_2O$ $M_w = 569,15$ (Fluka, Švica)
- agar-agar (Biolife, Italija)
- agaroza (Sigma, ZDA)
- amonijev klorid NH_4Cl $M_w = 53,49$ (Merck, Nemčija)
- brezvodni metanol CH_3OH $M_w = 32,04$ (Merck, Nemčija)
- cetil trimetil amonijev bromid (CTAB) $CH_3(CH_2)_{15}N(Br)(CH_3)_3$ $M_w = 364,45$ (Sigma, ZDA)
- destilirana voda
- D-fruktoza-6-fosfat dinatrijeva sol dihidrat $C_6H_{11}Na_2O_9P \cdot 2H_2O$ $M_w = 340,1$ (Fluka, Švica)
- D-(+)-glukoza $C_6H_{12}O_6$ $M_w = 180,16$ g/mol (Kemika, Hrvatska)
- D-glukoza-6-fosfat natrijeva sol $C_6H_{12}O_9PNa$ $M_w = 282,12$ (Fluka, Švica)
- dinatrijev hidrogen fosfat Na_2HPO_4 $M_w = 141,96$ (Merck, Nemčija)
- DNS reagent (3,5-dinitrosalicilna kislina)
- etilendiaminotraocetna kislina dinatrijeva sol dihidrat (EDTA) $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$ $M_w = 372,2$ (Sigma, ZDA)
- fosfoenolpiruvična kislina kalijeva sol (PEP-K) $C_3H_4KO_6P$ $M_w = 206,13$ (Fluka, Švica)
- fosforna kislina H_3PO_4 $M_w = 98,00$ (Sigma, ZDA)
- hidroksietil celuloza (HEC) (Ashland, ZDA)
- kalcijev klorid dihidrat $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ $M_w = 147,02$ (Sigma, ZDA)

- kalijev dihidrogen fosfat KH_2PO_4 $M_w = 136,09$ (Merck, Nemčija)
- kalijev klorid KCl $M_w = 74,55$ (Merck, Nemčija)
- klorovodikova kislina HCl $M_w = 36,5$ (Merck, Nemčija)
- kvasni ekstrakt (Biolife, Italija)
- led ocetna kislina $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ $M_w = 60,05$ (Sigma, ZDA)
- magnezijev klorid heksahidrat $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $M_w = 203,3$ (Merck, Nemčija)
- magnezijev sulfat heptahidrat $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $M_w = 246,48$ (Merck, Nemčija)
- manganov sulfat hidrat $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $M_w = 169,01$ (Kemika, Hrvaška)
- metanol CH_3OH $M_w = 32,04$ (Merck, Nemčija)
- miliQ voda (deionizirana voda)
- natrijev hidroksid NaOH $M_w = 40$ (Merck, Nemčija)
- natrijev klorid NaCl $M_w = 58,5$ (Merck, Nemčija)
- ninhidrin $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4$ $M_w = 178,14$ (Sigma, ZDA)
- ocetna kislina CH_3COOH $M_w = 60,05$ (Riedel-de Haën, Švedska)
- ogljikov dioksid CO_2 1 % (V/V) v N_2 (Messer, Slovenija)
- peptokompleks (Biolife, Italija)
- reduciran β -nikotinamid adenin dinukleotid dinatrijeva sol hidrat (NADH) $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{Na}_2\text{O}_{14}\text{P}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $M_w = 727,46$ (Fluka, Švica)
- toluen $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ $M_w = 92,14$ (Sigma, ZDA)
- tripton (Biolife, Italija)
- trishidroksimetil-aminometan hidroklorid (Tris-HCl) $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$ $M_w = 157,6$ (Sigma, ZDA)
- uranil acetat $\text{UO}_2(\text{OCOCH}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $M_w = 424,15$ (Sigma, ZDA)
- β -nikotinamid adenin dinukleotid fosfat dinatrijeva sol (NADP) $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_7\text{Na}_2\text{O}_{17}\text{P}_3$ $M_w = 787,38$ (Fluka, Švica)

3.1.2 Encimi

- aldolaza iz zajče mišice $M \sim 161000$ (Fluka, Švica)
- glicerol-3-fosfat dehidrogenaza iz zajče mišice $M \sim 78000$ (Fluka, Švica)
- L-laktat dehidrogenaza iz zajče mišice $M \sim 140000$ (Fluka, Švica)
- triozafosfat izomeraza iz *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma, ZDA)

3.1.3 Kompleti

- Live/Dead BacLight Kit (Invitrogen, ZDA)
- Komplet za izolacijo kromosomske DNK iz bakterijskih celic (Invitrogen, ZDA)

3.1.4 Antibiotiki

- Ampicilin (Sigma, ZDA)
- Eritromicin (Sigma, ZDA)
- Fleomicin (Sigma, ZDA)
- Kanamicin (Sigma, ZDA)

3.1.5 Sestava gojišč

3.1.5.1 Gojišče M9

Uporabljali smo tekoče gojišče M9 z naslednjo sestavo:

- 200 mL 5x M9 soli (64 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 15 g KH_2PO_4 , 5 g NH_4Cl , 150 g NaCl, 1000 mL dH₂O)
- 2 mL 1M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,1 mL 1M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 20 mL 500 g/L glukoze (končna koncentracija glukoze v gojišču je 10 g/L)
- 775 mL dH₂O

Za M9 gojišče z različnimi slanostmi smo dodali 5 g NaCl (za 0,5 % (w/V) NaCl) ali 100 g NaCl (za 10 % (w/V) NaCl). Za končno koncentracijo glukoze v gojišču 5 g/L smo dodali 10 mL 500 g/L glukoze, za 2 g/L glukoze pa 4 mL 500 g/L glukoze.

3.1.5.2 Gojišče PKS

Uporabljali smo tekoče gojišče PKS z dodatkom 3 % NaCl. Sestava gojišča je:

- 5 g peptokompleks
- 1 g kvasni ekstrakt
- 2 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 30 g NaCl (za 3 % (w/V) NaCl v gojišču)

- do 1 L dH₂O

Za trdna gojišča PKS smo dodali 15 g agar-agar na 1 L gojišča.

Za PKS gojišče z različnimi slanostmi smo dodali 5 g NaCl (za 0,5 % (w/V) NaCl) ali 100 g NaCl (za 10 % (w/V) NaCl).

3.1.5.3 Gojišče LB

Uporabljali smo tekoče gojišče LB. Sestava gojišča je:

- 10 g tripton
- 5 g kvasni ekstrakt
- 5 g NaCl
- do 1 L dH₂O

Za trdna gojišča LB smo dodali 15 g agar-agar na 1 L gojišča.

3.1.6 Bakterijski sevi in plazmidi

- *Vibrio ruber* DSM 14379 (*V. ruber*)
- *Vibrio ruber* B mut (*V. ruber* BM)
- *Vibrio ruber* R mut (*V. ruber* RM)
- *Vibrio harveyi* ATCC 1116 (BB120) (*V. harveyi*)
- *Escherichia coli* K-12 MG1655 (*E. coli*)
- *Bacillus subtilis* 216 (*B. subtilis*)
- *Bacillus* sp.
- pSC101 s fuzijo *sulA-gfp*

3.2 METODE

3.2.1 Spreminjanje viskoznosti rastnih medijev in meritve viskoznosti

Viskoznost smo merili na reometru Physica MCR-301 (Anton Paar, Graz, Austria), ki meri viskoznost na podlagi vrtenja ene plošče proti drugi, med katerima je vzorec. Temperatura pri meritvi je bila 25 °C, razdalja med ploščama 0,25 mm. Približno 750 µL vzorca smo nanesli med obe plošči. Reološke krivulje v območju strižne hitrosti med 1 in 1000 s⁻¹ smo

izmerili v 29 korakih izvedenih v razmaku 5 sekund. Če ni drugače povedano, so rezultati viskoznosti podani pri strižni hitrosti 1000 s^{-1} .

Da bi ugotovili kakšen vpliv ima izrabljeno gojišče bakterije *V. ruber* smo nacepili sev v M9 medij z 10 g/L glukoze in 1 % (w/V) HEC ter inkubirali 1 uro pri 28 °C in 200 rpm. Supernatant smo dobili s centrifugiranjem pri 9391 g za 10 min in ga potem inkubirali na sobni temperature ali 15 minut na 100 °C. Inkubacija na 100 °C je bila namenjena inaktivaciji morebitnih celulolitičnih encimov. Toplotno tretirani in netretirani vzorci so bili zmešani s sterilnim M9 medijem brez HEC v razmerju 1:1 (V/V). Viskoznost smo izmerili takoj po dodatku svežega medija in po 24 urah inkubacije na 28 °C. Kot kontrolo smo sterilnemu gojišču M9 z 10 g/L glukoze in 1 % (w/V) HEC dodali sterilno destilirano vodo v razmerju 1:1 (V/V).

3.2.1.1 Fizikalno-kemijske lastnosti rastnega medija

Koncentracijo raztopljenega kisika v tekočih mediji z in brez HEC smo izmerili z Oakton PCD 650 multimetrom (Oakton Instruments, Illinois, USA). Vodno aktivnost, a_w , gojišč z različnimi koncentracijami HEC smo izmerili s CX-1 sistemom (Campbell Scientific Ltd) po navodilih proizvajalca.

3.2.1.2 Celulolitična aktivnost bakterijskih sevov

Celulolitično aktivnost sevov smo določili po metodi, ki jo je opisal Miller (1959). Bakterijske seve smo nacepili v M9 medij z ustrezno slanostjo in koncentracijo glukoze ter 1 % (w/V) HEC. Hkrati smo nacepili tudi v enaka gojišča brez glukoze. Vzorce smo vzeli ob času inokulacije ter po 24 urah inkubacije na 28 °C in 200 rpm ter jim določili koncentracijo redukcijskih koncev. 1 mL vzorca smo centrifugirali ter supernatantu dodali 1 mL DNS reagenta. Mešanico smo 15 minut inkubirali na 100 °C, jo ohladili v vodni kopeli ter izmerili absorbanco pri 485 nm. Hkrati z vzorci smo naredili tudi vzorce sterilnih gojišč in standarde z glukozo. Iz umeritvene krivulje smo nato določili koncentracijo redukcijskih koncev, ki ponazarja celulolitično aktivnost sevov. Koncentracija redukcijskih sladkorjev smo podali v mM.

3.2.2 Gojenje bakterijskih sevov in določanje parametrov rasti

Če ni povedano drugače, smo bakterijske seve najprej nacepili v bogato gojišče (PKS s 3 % NaCl ali LB) in jih inkubirali preko noči ali najmanj 8 ur na ustrezni temperaturi in 200 rpm. Potem smo 1 % inokulum precepili v ustrezno minimalno (M9) ali kompleksno (PKS, LB) gojišče in inkubirali na ustrezni temperaturi in 200 rpm. Za rastne krivulje smo prvih 10 do 12 ur na vsako uro izmerili OD₆₅₀ na fotometru (Photometer MA9510, Iskra, Slovenija), potem pa še po 24 urah rasti. Za določanje aktivnosti metabolizma smo gojili seve do pozne logaritemske faze. Ker so sevi različno hitro rasli, je bil čas inkubacije odvisen od seva ter pogojev za rast. Za druge eksperimente je čas inkubacije podan pri ustremnem protokolu. Standardni pogoji za gojenje bakterijskih sevov so prikazani v preglednici 3.

Preglednica 3: Običajni rastni pogoji proučevanih bakterijskih sevov.

Table 3: Standard culturing conditions for tested bacterial strains.

| Bakterijski sev | Temperatura (°C) | Koncentracija glukoze (g/L) | Slanost (% NaCl) | Gojišče |
|--------------------------|------------------|-----------------------------|------------------|----------|
| <i>Vibrio ruber</i> | 28 | 10 | 3 | PKS / M9 |
| <i>Vibrio harveyi</i> | 28 | 5 | 3 | PKS / M9 |
| <i>Escherichia coli</i> | 37 | 2 | 0,5 | LB / M9 |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 37 | 5 | 1,5 | LB / M9 |

Izmerjenim optičnim gostotam vzorcev smo prilegali krivuljo z enačbo (Danevčič in sod., 2005)

$$OD_{650}(t) = \frac{K \cdot OD_{650,t_0}}{OD_{650,t_0} + e^{-\mu t} (K \cdot OD_{650,t_0})}, \quad \dots(3)$$

kjer je K nosilnost okolja, μ hitrost rasti (h^{-1}) in OD_{650,t_0} optična gostota pri 650 nm v času t = 0.

Rast bakterijskih celic smo spremljali tudi z določanjem števila bakterijskih kolonij na mL vzorca (CFU mL^{-1}). Fitnes bakterijskih celic smo izračunali kot naravni logaritem količnika med številom celic na koncu in številom celic na začetku inkubacije (Ahn in sod., 2006).

3.2.3 Velikost in običkanost celic

Velikost celic smo določili pod mikroskopom s programom AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Nemčija). Tip običkanosti smo določili s presevno elektronsko mikroskopijo (angl. transmission electron microscope (TEM)) na mikroskopu Philips CM100 (Philips Electronics N.V., Nizozemska). Bakterijske celice so bile negativno obarvane z 1 % (V/V) uranil acetatom.

3.2.4 Metabolna aktivnost celic

3.2.4.1 Merjenje mikrobne respiracije s plinsko kromatografijo

Bakterijski sev smo gojili do pozne logaritemske faze rasti, celice v 5 mL kulture sedimentirali s centrifugiranjem na 14972 g za 15 minut na 4 °C in jih sprali v raztopini NaCl z ustrezno koncentracijo soli. Le-ta je bila takšna kot v gojišču. Oprane celice smo resuspendirali v 5 mL ustrezno slane raztopine in jih plinotesno zaprli v stekleničke. Razmerje med plinsko in vodno fazo je bilo 2:1 (V/V). Količino CO₂ smo izmerili takoj po zaprtju stekleničke in po eni uri aerobne inkubacije na ustrezni temperaturi (Odić in sod., 2007). Količino sproščenega CO₂ smo merili na plinskem kromatografu z detektorjem za termalno prevodnost. Kontrolne vzorce so bile ustrezne raztopine NaCl. Število celic smo določili za vsak vzorec s štetjem CFU mL⁻¹). Rezultate smo podali kot mL sproščenega CO₂ na uro na celico (Odić in sod., 2007; Danevčič in Stopar, 2011; Danevčič, 2006). Relativna hitrost respiracije je bila normirana na hitrost respiracije pri najnižji viskoznosti (0,8 mPas).

3.2.4.2 Spektrofotometrično določanje celokupne dehidrogenazne aktivnosti bakterijskih celic

Za merjenje dehidrogenazne aktivnosti smo uporabljali redoks indikator trifeniltetrazolijev klorid (TTC), ki omogoča poenostavljeni merjenje dehidrogenazne aktivnosti (Danevčič, 2006). TTC je lahko prejemnik elektronov za mnoge dehidrogenaze, ki ga reducirajo v netopni formazan (TTF). Kristali slednjega se kopijo v aktivnih celicah, zato ga je potrebno ekstrahirati iz celic z organskimi topili (aceton, metanol) in meriti

spektrofotometrično. Pri redukciji TTC v TTF pride do spremembe barve iz rumene v vijolično.

Bakterijski sev smo gojili do pozne logaritemske faze rasti, celice v 10 mL kulture smo sedimentirali s centrifugiranjem na 14972 g za 15 minut na 4 °C in jih sprali v 20 mM Tris-HCl pufru (pH 7,4) z ustrezno koncentracijo soli. Oprane celice smo resuspendirali v 1 mL 20 mM Tris-HCl pufra z ustrezno koncentracijo soli in jim dodali 1 mL 1 % (w/V) TTC v 0,1 M Tris-HCl (pH 7,7), 50 µL 0,5 M KH₂PO₄ in 50 µL 1 M glukoze. TTC ni bil dodan v kontrolne vzorce. Vse vzorce smo inkubirali eno uro na ustrezni temperaturi s stresanjem pri 200 rpm. Nastali TTF smo z metanolom ekstrahirali iz celic 15 minut, ki smo jih sedimentirali s centrifugiranjem. Koncentracijo nastalega TTF smo določili spektrofotometrično pri valovni dolžini 485 nm. Količino proteinov v celicah smo določili z meritvijo proteinov na spektrofotometru Nanodrop (Thermo Fischer Scientific, ZDA) ali z Bradfordovim reagentom (Sigma, ZDA) po navodilih proizvajalca. Dehidrogenazna aktivnost smo podali kot µmol nastalega TTF na minuto na mg proteina. Relativna dehidrogenazna aktivnost je bila normirana na dehidrogenazno aktivnost izmerjeno pri najnižji viskoznosti (0,8 mPas).

3.2.4.3 Aktivnost glikolitičnih encimov

Bakterijski sev smo gojili do pozne logaritemske faze rasti, celice v 10 mL kulture sedimentirali s centrifugiranjem na 14972 g za 15 minut na 4 °C in jih sprali v raztopini NaCl z ustrezno koncentracijo soli. Celične ekstrakte smo pripravili po protokolu, ki ga navajata Danevčič in Stopar (2011). Celice smo 300-krat skoncentrirali in ultrazvočno sonicirali v 12 korakih po 30 sekund s 30 sekundami pavze. Amplituda ultrazvoka je bila 6 µm, moč pa 3,5 W/cm². S tem smo sprostili celične encime. Ekstrakte smo pridobili s centrifugiranjem pri 10397 g for 10 min in sobni temperaturi in jih shranili na -20 °C. Aktivnost encimov piruvat kinaza in glukoza-6-fosfat dehidrogenaza smo izmerili po protokolu Padilla in sod. (2004). Pri določanju aktivnosti piruvat kinaze je bil uporabljen 1 mM NADH namesto 3 mM NADH kot je v originalnem protokolu. Fosfofruktokinazno aktivnost smo določili po protokolu Andersen in sod. (2001), pri čemer je bila končna koncentracija NADH 0,5 mM namesto 0,2 mM kot je v originalnem protokolu. Kinetiko vseh glikolitičnih encimov smo izmerili preko porabe ali sinteze NADH. Absorbanca NADH je bila izmerjena spektrofotometrično pri valovni dolžini 340 nm. Spremembe v A₃₄₀ smo merili 20 minut v korakih po pol minute. Naklon linearnega dela kinetičnih krivulj predstavlja hitrost encimske reakcije. Koncentracijo proteinov smo določili na

spektrofotometru Nanodrop (Thermo Fischer Scientific, ZDA) ali z Bradfordovim reagentom (Sigma, ZDA) po navodilih proizvajalca. Rezultati encimskih aktivnosti smo preračunali po protokolu Danevčič in Stopar (2011) in so podani kot U na mg proteina. Relativne encimske aktivnosti so bile normalizirane na encimsko aktivnost pri najnižji viskoznosti (0,8 mPas).

3.2.4.4 Koncentracija L-prolina

Koncentracijo L-prolina v celicah bakterije *V. ruber* smo določili spektrofotometrično po protokolu Danevčič in Stopar (2011). 4 mL celic v določeni fazi rasti smo centrifugirali na 14972 g 10 minut. Pelet smo resuspendirali v 1,7 mL 0,1 % (w/v) cetil trimetil amonijev bromid (CTAB) in vorteksirali 5 minut. Celice smo odstranili s centrifugiranjem pri 14972 g 10 minut. 1 mL supernatanta smo zmešali z 1 mL led ocetne kisline in 1 mL sveže pripravljenega ninhidrinskega reagenta (1,25 g ninhidrin, 30 mL led ocetne kisline, in 20 mL 6 M fosforne kisline). V kontrolne vzorce nismo dodali ninhidrina. Mešanice smo segrevali na 100 °C v pečici 1 h. Ko so se ohladili, smo dodali 2 mL toluena in vzorce stresali 10 minut na 200 rpm in 28 °C. Po 30 minutah stanja na sobni temperaturi, ko so se faze ločile, smo toluensko fazo v treh ponovitvah nanesli v mikrotitrski plošče in izmerili absorbanco pri valovni dolžini 520 nm. Absorbanco smo nato pretvorili v koncentracijo L-prolina s pomočjo umeritvene krivulje standardov L-prolina v 0,1 % (w/v) CTAB. Za vsak vzorec smo določili tudi težo suhe mase, tako da smo 40 mL kulture centrifugirali, jo sprali v fiziološki raztopini, in posušili na 105 °C v pečici. Po 24 urah sušenja smo stehtali maso suhih celic. Rezultati so podani kot mg L-prolina na mg suhe mase celic.

3.2.4.5 Sinteza EPS

Bakterijo *V. ruber* smo gojili v gojišču M9 z 10 g/L glukoze in ustrezno koncentracijo HEC do pozne logaritemske faze rasti. 10 mL bakterijske kulture smo zmešali z 10 mL fosfatnega pufra (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄ na liter destilirane vode, pH 7). Mešanice smo prenesli v mikrocentrifugirke in jih sonicirali (5 sekund z amplitudo ultrazvoka 12 µm in močjo 3,5 W/cm²) da se je sprostil prosti EPS. Za izolacijo vezanega EPS smo dodali 1 M NaOH v končni koncentraciji 0,1 M (Li in sod., 2002), kratko vorteksirali in inkubirali 5 minut na sobni temperaturi. Vzorce smo nato hitro vorteksirali in inkubirali 5 minut na ledu preden smo dodali hladen 1 M HCl do končne

koncentracije 0,2 M. pH vzorcev je bil 1,7, kar je preprečilo precipitacijo HEC in soli v mediju. Vzorce smo nato centrifugirali na 10397 g 15 minut na 4 °C da smo odstranili celice. Alikvot supernatanta smo prenesli v trikratni volumen hladnega 96 % etanola (D'Abzac in sod., 2010) in inkubirali 20 ur na 4 °C, da se je EPS precipitiral. Precipitirani EPS smo ločili s centrifugiranjem na 10397 g 10 min pri 4 °C in ga raztopili v 10-kratnem volumnu destilirane vode. EPS smo nato še enkrat precipitirali, preden smo ga posušili na 105 °C. Posušeni EPS smo stehtali, da smo določili količino nastalega EPS na celico. Med ekstrakcijo se HEC ni precipitiral. Število celic smo določili s številom CFU na mL.

3.2.5 Sekundarni metabolizem bakterije *Vibrio ruber*

3.2.5.1 Karakterizacija prodigiozinu podobnega pigmenta

Pigment, ki ga proizvaja bakterija *V. ruber*, smo ekstrahirali z metanolom iz bakterijske kulture gojene do stacionarne faze v gojišču M9 z 5 g/L glukoze. Metanol smo odstranili z rotavaporjem. Vzorci so bili nato obdelani po protokolu, ki ga je opisala Alihosseini s sodelavci (2008). Hidrofilne kontaminacije so bile odstranjene z ekstrakcijo v mešanici klofororma in vode, organska faza pa je bila skoncentrirana z rotavaporjem. Posušeni ekstrakt smo čistili s gelsko kromatografijo (20 cm × 20 cm; silika gel 60; Merck, Nemčija) in visokotlačno tekočinsko kromatografijo, kot je opisala Alihosseini s sodelavci (2008). Identifikacija prodigiozina je bila izvedena s tekočinsko kromatografijo povezano z masnim spektrometrom (LC–MS). LC-MS analiza je potekala s kromatografijo na reverzni fazi, pri čemer je bil sistem topil mešanica acetonitrila in metanola (1:1 (V/V)) kot topilo B in 13 mM amonijev acetat (pH 5,5) kot topilo A. Pretok je bil 0,3 mL/min pri 40 °C, kolona pa Acquity UPLC BEH C18 (150 mm × 2,1 mm, velikost delcev 1,7 µm). Po pol minute izokratskega pretoka pri 15 % topila B, se je gradient do 100 % koncentracije topila B končal v 20 minutah. HPLC je bil neposredno zvezan z masnim spektrometrom (Finnigan LTQ, Thermo Electron Co., ZDA). Pritisak dušikovega plina je bil 7 bar pri pretoku 2–3 L/min, napetost pa 5 kV. Temperatura kapilare je bila 350 °C.

3.2.5.2 Dinamika sinteze prodigiozina

Za določanje dinamike sinteze prodigiozina smo v rednih časovnih intervalih iz kulture *V. ruber*, ki je rasla v ustrezнем gojišču na 28 °C, odvzeli 1,5 mL in centrifugirali na 10397 g

10 minut. Supernatant smo odstranili in celice resuspendirali v enakem volumnu acetona. Mešanice smo nato inkubirali 90 minut s stresanjem na 200 rpm in jih potem centrifugirali 15 minut na 10397 g. Vsakemu vzorcu smo izmerili absorpcijski spekter v območju 380 do 600 nm na spektrofotometru (Thermo Electron Company, Vantaa, Finland), in na podlagi umeritvene krivulje določili koncentracijo pigmenta. HEC ni imel vpliva na ekstrakcijo pigmenta. To je bilo preverjeno tako, da smo celice najprej resuspendirali v vodnih raztopinah z različnimi koncentracijami HEC, vorteksirali in nato po centrifugiranju izvedli ekstrakcijo acetonu. Koncentraciji pigmenta v času smo v programu Origin 7.5 (OriginLab Corp., ZDA) nalegali Boltzmannova enačbo (R^2 za vse fite je bil višji od 0,997). Uporabljeni Boltzmannova enačba je bila:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A_2 \quad \dots(4),$$

pri čemer A_1 predstavlja začetno koncentracije pigmenta, A_2 končno vrednost koncentracije pigmenta, x čas, dx časovno konstanto, x_0 pa središče funkcije.

Dobljene rezultate smo s programom Origin 7.5 odvajali po času in jim nalegali Gaussovo porazdelitev (R^2 za vse fite je bil višji od 0,998). Uporabljeni Gaussova porazdelitvena funkcija je bila:

$$y = y_0 + \frac{A}{W\sqrt{\pi/2}} e^{-2\frac{(X-X_c)^2}{W^2}} \quad \dots(5),$$

pri čemer y_0 predstavlja začetno vrednost, X_c središče funkcije, A površino pod krivuljo, W pa širino krivulje.

Dva parametra Gaussove porazdelitve smo uporabili za opis dinamike sinteze pigmenta – širina porazdelitve (W) predstavlja trajanje intenzivne sinteze pigmenta, medtem ko čas (X_c), pri katerem ima porazdelitev vrh, predstavlja čas, ko je sinteza pigmenta maksimalna. Kot čas indukcije sinteze pigmenta smo vzeli čas, pri katerem je bila vrednost prvega odvoda višja od 0,3.

Za določanje spektra pigmenta, smo bakterijo *V. ruber* gojili v PKS s 3 % NaCl do stacionarne faze rasti in iz celic ekstrahirali pigment z metanolom. Absorpcijski spekter smo izmerili v UV Star Plates (Greiner Bio One, Nemčija) v območju valovnih dolžin od 240 do 600 nm. Izmerili smo tudi spekter ekstrakta iz bakterije *V. ruber* BM.

3.2.5.3 Vpliv L-prolina, L-metionina in ATP na dinamiko sinteze prodigiozina

Vpliv eksogeno dodanega L-prolina, L-metionina in ATP na dinamiko sinteze prodigiozina smo preverjali v gojišču M9 z 1 % (w/V) HEC (viskoznost 29,4 mPas). Prekonočno kulturo *V. ruber* smo 100-krat redčili v svežem M9 gojišču in inkubirali na 28 °C in 200 rpm. Po 5,5 urah rasti smo dodali 10 mM L-prolin, 2 mM L-metionin, in 10 µM ATP. V teh koncentracijah le-ti ne vplivajo na bakterijsko rast. Testirali smo tudi hkraten dodatek L-prolina in L-metionina. Dinamiko sinteze pigmenta smo določili kot je opisano zgoraj.

3.2.5.4 Fitnes prezgodaj pigmentiranih celic

Bakteriji *V. ruber* smo predčasno inducirali pigmentiranost z dodatkom 10 mM L-prolina in 2 mM L-metionina po 5,5 urah rasti. Po dodatnih 90 minutah inkubacije so samo celice z dodanimi aminokislinami začele sintetizirati pigment. V teh točkah smo celice sedimentirali s centrifugiranjem, jih dvakrat oprali v fiziološki raztopini in inokulirali v sveže M9 gojišče z 1 % HEC. Število celic smo določili ob re-inokulaciji ter po 14 urah inkubacije na 28 °C in 200 rpm. Maltuzijski fitnes smo izračunali kot naravni logaritem razmerja med končnim in začetnim številom celic (Ahn in sod., 2006).

3.2.6 Medcelična komunikacija

Količino komunikacijskih signalov smo doličili preko pigmentiranosti seva *V. ruber* RM, ki ima okvarjeno sintezo pigmenta, vendar pa le-to začne, če se doda izrabljeno gojišče divjega tipa bakterije *V. ruber* (WT). Mutanta se ne pigmentira, če ji dodamo L-prolin, L-metionin ali ATP. Prekonočno kulturo *V. ruber* WT smo 100-krat razredčili v svežem M9 gojišču z ustrezno viskoznostjo in jo inkubirali 5,5 ali 16 ur na 28 °C in 200 rpm. Celice smo odstranili s centrifugiranjem na 10397 g 15 min pri 4 °C. Supernatant s signalnimi molekulami so filtrirali skozi filtre z velikostjo por 0,2 µm (Millipore, ZDA) in ga dodali svežemu PKS gojišču s 3 % (w/V) NaCl v razmerju 1:1 (V:V). V tak medij smo nacepili *V. ruber* RM in inkubirali 16 ur na 28 °C in 200 rpm. Koncentracijo nastalega prodigiozina smo določili, kot je opisano zgoraj. Ker bi se lahko signalne molekule vezale na HEC (Piletska in sod., 2010; Decho in sod., 2011) in bi se zato izgubile med filtriranjem, smo

naredili kontrolne eksperimente, v katerih smo izrabljenemu gojišču seva *V. ruber* WT dodali PKS z HEC v končni koncentraciji 0, 0,5 in 1 % (w/V). Po 16 urah inkubacije na 28 °C in 200 rpm for 16 h, smo mešanice filtrirali in vanje nacepili sev *V. ruber* RM. Pigmentacijski odziv mutante smo določili kot je opisano zgoraj. Le pri najvišji koncentraciji HEC se je odziv poročevalskega seva znižal in je bil glede na najnižjo viskoznost $73,0 \pm 18,0$ %. Ta podatek smo uporabili za popravek določene koncentracije signalnih molekul pri najvišji viskoznosti. Koncentracija signalnih molekul pri posamezni viskoznosti je bila predstavljena kot razmerje med nastalim prodigiozinom v poročevalskem sevu pri posamezni viskoznosti in nastalim prodigiozinom pri najnižji viskoznosti.

3.2.7 Odpornost proti UV sevanju

10 mL kulture bakterije *V. ruber* WT v različnih fazah rasti smo prenesli v sterilne petrijevke in izpostavili UV sevanju z UVC žarnico (JuGuang, China). Različne doze sevanja (54 J/m^2 , 162 J/m^2 , 324 J/m^2) smo dosegli z različno dolgimi časi izpostavljanja (10, 30 in 60 sekund). Med obsevanjem smo kulturo mešali, da je bila kultura homogeno izpostavljena. Po obsevanju smo 1 mL kulture dodali 1 mL svežega PKS gojišča z 3 % NaCl, jih inkubirali 1 uro na 28 °C in 200 rpm ter določili število celic s CFU mL⁻¹. Neobsevane kulture smo uporabili za določanje števila celic pred obsevanjem. Vse vzorce smo mikroskopirali, da bi opazovali spremembe v morfologiji, ki bi kazale na možnost tvorbe živih, vendar neaktivnih celic (angl. viable but not culturable (VBNC)). Morfologija obsevanih kot tudi kontrolnih vzorcev je bila enaka, zato je bilo določanje CFU primerena metoda za določanje števila celic. Enake eksperimente smo izvedli tudi za bakterijo *V. ruber* BM.

Za primerjavo preživetja UV sevanja v različnih fazah rasti smo izračunali Maltuzijski fitnes (Ahn in sod., 2006). Poleg tega smo krivuljam preživetja (Moeller in sod., 2005) (razmerje med številom perživelih celic in številom celic na začetku eksperimenta pri določeni dozi sevanja) določili karakteristične parametre F10 in IC (Bauermeister in sod., 2009; Moeller in sod., 2005). F₁₀ parameter je definiran kot doza UV sevanja potrebna za inaktivacijo 90 % začetne populacije. Določen je bil neposredno iz krivulj preživetja. IK je inaktivacijska konstanta, ki smo jo določili iz naklona krivulje preživetja.

Da bi preverili vpliv eksogeno dodanega prodigiozina na preživetje bakterije *V. ruber* NP, smo le-to gojili 8 ur v PKS gojišču z 3 % NaCl in ob času inokulacije dodali 2,8; 13,7 ali 41,1 mg/L ekstrakta pigmenta iz bakterije *V. ruber*. Kot kontrolo smo dodali enako količino etanola. Po osmih urah rasti smo določili fitnes seva *V. ruber* BM ter izmerili koncentracijo prevzetega pigmenta. Dodatek etanola ni vplival na rast in UV odpornost nepigmentirane mutante.

Določili smo še preživetje sevov v kokulturah z bakterijo *V. ruber*, pri čemer je bil enkrat partner *V. ruber* NP, drugič pa *V. harveyi* ATCC 1116. Sevi so bili ločeno gojeni v PKS gojišču s 3 % NaCl na 28 °C. Kokulture smo nacepili v razmerju 1:1, tako da je bil končni inokulum 1 % (V/V). Kokulture smo inkubirali 8 ur na 28 °C in 200 rpm. Obsevanje z UV, kvantifikacija pigmenta in Maltuzijski fitnes so bili določeni kot je opisano zgoraj. Relativna zastopanost posameznega seva je bila izračunana kot razmerje med številom celic enega seva in številom vseh celic.

3.2.7.1 Vpliv viskoznosti na odpornost proti UV sevanju

Bakterijo *V. ruber* smo gojili v gojišču PKS s 3 % NaCl preko noči na 28 °C. Prekonočno kulturo smo 100-krat razredčili v svežem gojišču PKS s 3 % NaCl brez in z dodanim HEC v koncentraciji 0,5 in 1 % HEC. Celice smo izpostavili različnim dozam UV sevanja kot je opisano zgoraj in določili število celic, na podlagi katerega smo izračunali fitnes. Enake eksperimente smo ponovili tudi za nepigmentirano mutanto bakterije *V. ruber* (BM) ter za kokulturo obeh sevov kot je opisano zgoraj.

3.2.8 Kokulture

3.2.8.1 Gojenje kokultur

Bakterijske seve *V. harveyi* ATCC BAA-1116, *E. coli* MG1655, *B. subtilis* 216 in *Bacillus* sp. smo gojili v kokulturah z *V. ruber* ali z *V. ruber* NP. Seve smo ločeno gojili v PKS gojišču s 3 % NaCl ali LB (za *E. coli* in *B. subtilis*) preko noči na 28 °C in 200 rpm. Kokulture smo nacepili v razmerju *V. ruber* : bakterijski sev 1:2 (V/V) ali 1:3 (V/V) za kokulture z bakterijama iz rodu *Bacillus*. Število celic (CFU) smo določili na začetku in koncu 20 urne inkubacije na 28 °C in 200 rpm. CFU smo določali na PKE ploščah brez

NaCl (za *E. coli*, *B. subtilis* in *Bacillus* sp.) ter na PKS ploščah s 3 % NaCl (za vse seve). Bakteriji *V. ruber* BM in *V. harveyi* smo ločili z gojenjem na PKS ploščah z 8 % NaCl, na katerih bakterija *V. harveyi* ne raste. Maltuzijski fitnes sevov smo izračunali na podlagi števila celic (Ahn in sod, 2006). Koncentracijo prodigiozina smo določili kot je opisano zgoraj.

3.2.8.2 Vrednosti MIK, MIC_{50} in MBK

MIK vrednosti smo določili v mikrotitrskih ploščah po standardih CLSI (CLSI, 2009). Bakterijske seve smo gojili v LB ali PKS mediju preko noči na 37 °C in 200 rpm. Prekonočne kulture smo redčili v fiziološki raztopini tako, da je bilo približno število celic v posamezni jamici mikrotitrsko plošče 5×10^5 . Plošče smo inkubirali na ustrezni temperaturi 20 ur in izmerili optično gostoto. Najnižjo koncentracijo prodigiozina v jamici, v kateri ni bilo rasti, smo vzeli kot minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK). Vzorci iz vseh jamic, v katerih ni bilo rasti, so bili nacepljeni na PKS plošče, ki smo jih inkubirali na ustrezni temperaturi 24 ur. Najnižja koncentracija prodigiozina, pri kateri ni bilo bakterijske rasti, predstavlja minimalno baktericidno koncentracijo (MBK). MIC_{50} je koncentracija prodigiozina, ki inhibira rast bakterijskega seva tako, da je njegov OD_{650} enak 50 % vrednosti OD_{650} istega seva, ki ni bil tretiran s pigmentom (Štraser, 2008).

3.2.9 Mehanizem protibakterijskega delovanja prodigiozina

3.2.9.1 Tretiranje bakterije *E. coli* z ekstraktom prodigiozina

E. coli smo gojili v LB mediju preko noči na 37 °C in 200 rpm. Prekonočne kulture smo 100-krat razredčili v 20 mL svežega LB medija in inkubirali na 37 °C pri 200 rpm. Optično gostoto smo merili v rednih časovnih intervalih. Ko so kulture dosegle optično gostoto med 0,4 in 0,5, smo celicam dodali 10, 60 ali 120 µg/mL prodigiozina. Kot kontrolo smo dodali enako količino sterilnega 96 % etanola. Maksimalna končna koncentracija etanola v kontrolah je bila 4,44 %. Optično gostoto smo merili naprej in določili CFU v točki pred tretiranjem s pigmentom in 1, 3, 5 oziroma 21,5 ur po tretiranju. Na podlagi števila celic smo izračunali Maltuzijski fitnes (Ahn in sod., 2006).

3.2.9.2 Prevzem prodigiozina

Sposobnost prevzema prodigiozina smo preverili v nativnih in avtoklaviranih celicah bakterije *E. coli*. Celice smo gojili v LB mediju pri 37 °C preko noči in jih 100-krat razredčili v 20 mL svežega LB medija. Ko so celice dosegle OD med 0,4 in 0,5, smo kulturo centrifugirali 10 min pri 10000 rpm in oprali v fiziološki raztopini. Suspenzijo smo razdelili na dva dela, pri čemer smo enega avtoklavirali 15 minut pri 121 °C. Po tem, smo celice znova oprali in jim dodali 120 µg/mL prodigiozina in jih inkubirali na 37 °C. Po 5 urah smo iz celic ekstrahirali pigment in ga kvantificirali kot je opisano v referencah (Starič in sod., 2010; Borić in sod., 2011). Kot kontrolo smo uporabili tretma z etanolom.

3.2.9.3 Morfologija in intaktnost membrane s prodigiozinom tretiranih bakterijskih celic

Bakterijo *E. coli* smo gojili v LB mediju kot je opisano zgoraj in celice tretirali s prodigiozinom pri optični gostoti med 0,4 in 0,5. Morfologijo celic smo preverili na invertnim mikroskopom Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Nemčija) v časovnih točkah 0,5, 1, 3, 5 in 21,5 ur po tretmaju. Velikost celic smo izmerili s programom AxioVision. Preverili smo tudi viabilnost celic tretiranih s pigmentom ali etanolom, tako, da smo jih barvali z Live/Dead BacLight bakterijskim testom (Invitrogen, USA) po navodilih proizvajalca. Mikroskopski preparat smo pogledali na mikroskopu Axio Observer Z1 s fluorescenčnimi filterji za barvili propidijev iodid in SYTO 9, ki sta uporabljeni v BacLight testu.

3.2.9.4 Izolacija in tretiranje kromosomalne DNK s prodigiozinom

Kromosomalno DNK smo izolirali s kompletom za izolacijo kromosomalne DNK (Promega, USA) iz netretiranih in s prodigiozinom ali etanolom tretiranih *E. coli* celic. Gelsko elektroforezo smo izvajali v 0,8 % agaroznem gelu na 75 V za 1 h. Dodatno smo kromosomalno DNK iz netretiranih *E. coli* celic tretirali s 60 in 120 µg/mL prodigiozina za 30 min in jo potem naložili na 0,8 % agarozni gel. Elektroforezo smo izvedli kot je opisano zgoraj. Gele smo barvali z etidijevim bromidom in jih slikali pod UV svetlogo.

3.2.9.5 Priprava seva s fuzijo *sulA-gfp* in indukcija SOS odziva

Kompetentne celice bakterije *E. coli* smo pripravili in transformirali s plazmidno DNK, ki vsebuje promotor gena *sulA* spojen s genom *gfp* po protokolu (Sambrook in Russel, 2001). Transformante smo izolirali na LB agarju z dodanim 50 µg/mL kanamicinom. Izbrani sev smo tretirali z različnimi koncentracijami prodigiozina in etanola (10, 60 in 120 µg/mL). Pozitivno kontrolo za indukcijo SOS odziva je bila izpostavljenost UV sevanju za 30 sekund. Po 30 minutah inkubacije na 37 °C, smo preverili fluorescenco sevov pod mikroskopom Axio Observer Z1 in fluorescenčnim filtrom za GFP.

3.2.9.6 Metabolna aktivnost s prodigiozinom tretiranih celic

E. coli MG1655 smo gojili do stacionarne faze rasti v LB mediju pri 37°C in 200 rpm. Kulturo smo 100-krat razredčili v 25 mL svežega LB medija in plinotesno zaprli v penicilinke. Količino nastalega CO₂ smo izmerili na plinskem kromatografu v rednih časovnih intervalih (Odić in sod, 2007; Ivančič in sod., 2009; Danevčič in Stopar, 2011). Celice smo tretirali s prodigiozinom ali etanolom po 2,5 urah in nadaljevali z merjenjem količine CO₂. Respiratorno aktivnost smo izrazili kot mL nastalega CO₂.

3.2.9.7 Občutljivost na tretiranje z antibiotiki

Občutljivost bakterije *E. coli* MG1655 na izbrane antibiotike smo določili preko preživetja celic (Dorr in sod., 2009) po tretmaju z 5 µg/mL fleomicina (Phl), 100 µg/mL eritromicina (Ery), 100 µg/mL kanamicina (Kn) in 100 µg/mL ampicilina (Amp). Omenjeni antibiotiki poškodujejo DNK (Phl), inhibirajo sintezo proteinov (Ery in Kn) ter inhibirajo sintezo celične stene (Amp). Prekonočne kulture smo 100-krat razredčili v 100 mL svežega LB medija in inkubirali 2,5 ur pri 37 °C in 200 rpm. Ko so kulture dosegle optično gostoto med 0,4 in 0,5, smo jih tretirali z 120 µg/mL prodigiozina, enako količino etanola ali sterilne destilirane vode in dalje inkubirali na 37 °C s stresanjem. Alikvote po 5 mL smo prenesli v sterilne epruvete, in jim dodali sterilno destilirano vodo ali antibiotik. Epruvete smo inkubirali 3 ure na 37 °C in 200 rpm. Število celic (CFU) smo določili pred tretmajem z antibiotiki in 3 ure po inkubaciji z antibiotiki. Preživetje je podano kot odstotek preživelih celic (razmerje celic po in pred inkubacijo z antibiotiki pomnoženo s 100).

3.2.10 Statistična obdelava rezultatov

Vse rezultate smo statistično analizirali s Studentovim t testom za dva neodvisna vzorca. Vzorci s p-vrednostjo enako ali nižjo od 0,05 so bili statistično različni.

4 REZULTATI

4.1 SPREMINJANJE VISKOZNOSTI RASTNEGA MEDIJA IN FIZIKALNO-KEMIJSKE ZNAČILNOSTI LE-TEGA

Za spremjanje viskoznosti gojišč smo uporabljali polimer hidroksietil celuloza (HEC), ki smo ga dodajali v petih različnih koncentracijah. Polimer smo izbrali na podlagi preliminarnih rezultatov, ki so pokazali, da bakterija *V. ruber* ne more uporabljati HEC kot edini vir ogljika v gojišču (Priloga A). Kot je razvidno iz Preglednice 4, dodatek HEC spremeni viskoznost gojišča. Ker bi lahko prisotnost polimera poleg reoloških značilnosti spremenila tudi druge fizikalno-kemijske parametre, smo nekatere najpomembnejše za rast bakterij določili. V uporabljenem koncentracijskem območju HEC ni bistveno spremenil pH vrednosti gojišč, vodno aktivnost kot tudi koncentracijo raztopljenega kisika (Preglednica 4). Zato smo predpostavili, da prisotnost polimera HEC spremeni le reološke značilnosti gojišč. Ker statistično značilnih razlik v fizikalno-kemijskih parametrih med minimalnim M9 in kompleksnim PKS gojiščem nismo izmerili, so rezultati v preglednici 4 podani le za gojišče M9 z 10 g/L glukoze.

Preglednica 4: **Fizikalno-kemijske značilnosti gojišč z dodano hidroksietil celulozo (HEC).** Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n = 5$).

Table 4: **Physico-chemical characteristics of growth media with added hydroxyethyl cellulose (HEC).**
Results are shown as averages and standard deviations ($n = 5$).

| Koncentracija HEC (%) | Viskoznost (mPas) | pH | Vodna aktivnost | Koncentracija O_2 (mg/L) |
|--------------------------|----------------------|---------------|--------------------|-------------------------------|
| 0 | $0,8 \pm 0,1$ | $6,9 \pm 0,1$ | $0,99 \pm 0,03$ | $5,4 \pm 0,1$ |
| 0,1 | $1,3 \pm 0,1$ | $6,9 \pm 0,1$ | $0,99 \pm 0,03$ | $5,3 \pm 0,1$ |
| 0,25 | $2,4 \pm 0,1$ | $6,9 \pm 0,1$ | $0,99 \pm 0,03$ | $5,3 \pm 0,2$ |
| 0,5 | $8,0 \pm 1,0$ | $6,9 \pm 0,1$ | $0,99 \pm 0,03$ | $5,3 \pm 0,1$ |
| 1 | $29,4 \pm 2,6$ | $6,9 \pm 0,1$ | $0,99 \pm 0,03$ | $5,2 \pm 0,1$ |

4.2 VPLIV VISKOZNOSTI MEDIJA NA FIZIOLOGIJO BAKTERIJE *VIBRIO RUBER*

4.2.1 Viskoznost kot samostojen dejavnik okolja

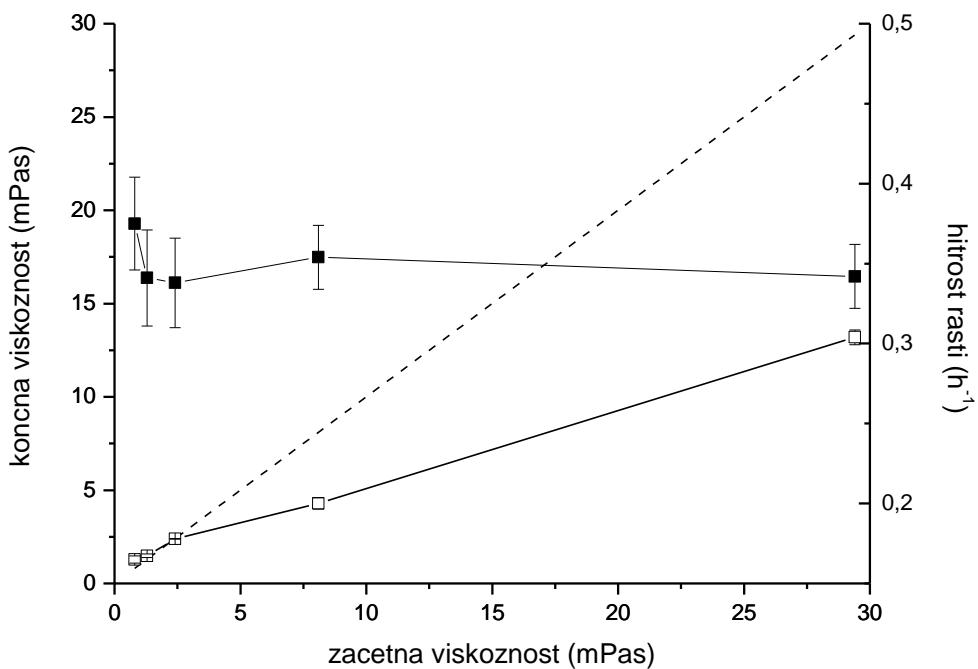
Na podlagi literature (Sauer in sod., 2002; Anderl in sod., 2003; Walters in sod., 2003; Borriello in sod., 2004; Resch in sod., 2005; Resch in sod., 2006; Folsom in sod., 2010; Kapetanakou in sod., 2011) smo predpostavili, da viskoznost vpliva na fiziologijo bakterije *V. ruber* tako, da

- se hitrost rasti zniža pri višjih viskoznostih,
- je sinteza prodigiozina in EPS zmanjšana,
- se z višanjem viskoznosti povečuje intenzivnost metabolizma,

kar smo eksperimentalno preverili.

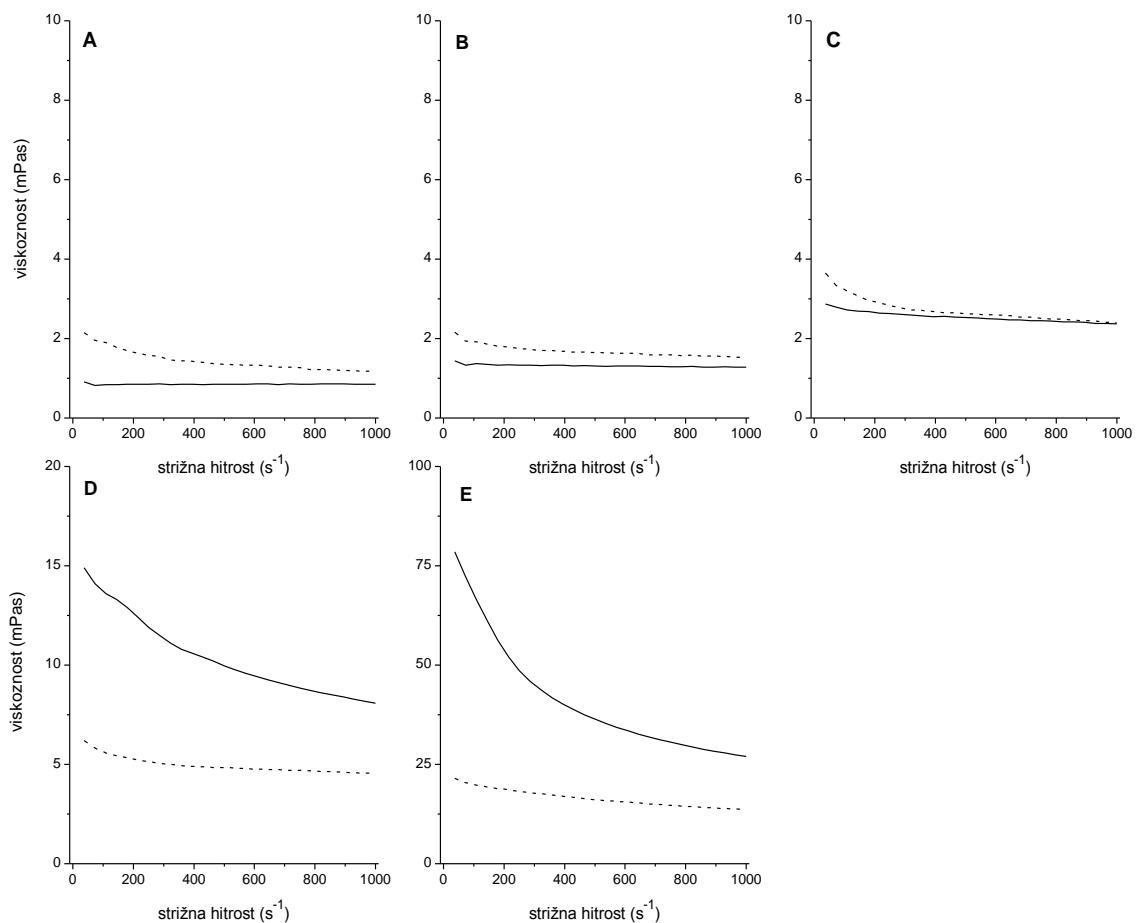
4.2.1.1 Rast, spremembe viskoznosti in sinteza EPS

Bakterijo *V. ruber* smo gojili v minimalnem M9 gojišču ter spremljali rast. Po 24 urah rasti smo izmerili viskoznost kultur in jo primerjali z viskoznostjo sterilnih gojišč. Hitrost rasti bakterije *V. ruber* je bila približno enaka pri vseh viskoznostih gojišča M9, medtem ko se je viskoznost kultur dramatično zmanjšala, ko je viskoznost začetnih gojišč presegla 2,4 mPas (Slika 7). Do te meje je bakterija *V. ruber* povzročila majhno, a signifikantno zvišanje viskoznosti (p-vrednosti 0,010 in 0,003). Reološke krivulje pri vseh testiranih strižnih hitrostih so prikazane na sliki 8.



Slika 7: Spremembe viskoznosti M9 medija pred (črtkana črta) in po inkubaciji z bakterijo *V. ruber* (prazni simboli). Viskoznost je bila izmerjena po 24 urah inkubacije. Polni simboli predstavljajo hitrost rasti bakterije *V. ruber*. Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n \geq 3$).

Figure 7: Changes of viscosity of the M9 medium supplemented with HEC incubated with *V. ruber* (open symbols) and without *V. ruber* (dashed line). Viscosities were measured at the beginning and at the end of the incubation. Filled symbols represent the growth rate of *V. ruber*. The values presented are means and standard deviations ($n \geq 3$).

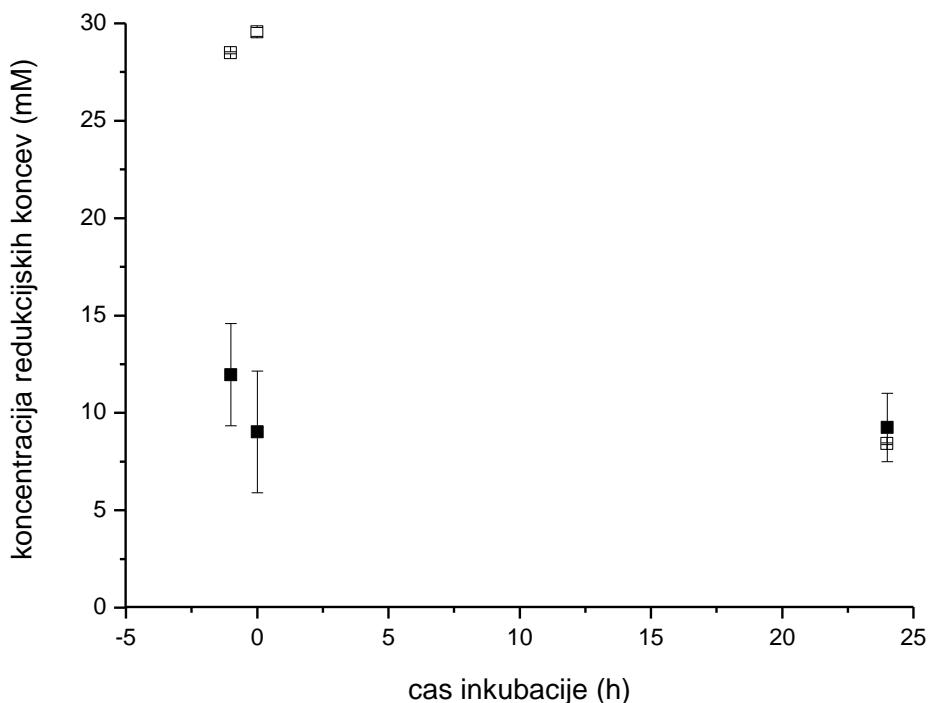


Slika 8: **Reologija kultur bakterije *V. ruber* po 24 urah rasti v M9 z 0 % (A), 0,1 % (B), 0,25 % (C), 0,5 % (D) in 1 % (E) skupaj reologijo pripadajočih sterilnih gojišč (polna črta). Grafa D in E imata drugačno y-os.**

Figure 8: **Rheology of *V. ruber* cultures grown for 24 hours (dotted line) in M9 (A), M9 with 0,1 % HEC (B), M9 with 0,25 % HEC (C), M9 with 0,5 % HEC (D), and M9 with 1 % HEC (E) together with the respective sterile media (solid line).** It should be noted that the y-axis in panels D and E have different values, i.e 0 - 20 and 0 - 100 mPas, respectively.

Sprememba viskoznosti med rastjo bi lahko bila posledica encimske razgradnje HEC, saj so bakterije iz rodu *Vibrio* poznane po sintezi in izločanju encimov za razgradnjo polimerov (Keyhani in Roseman, 1999; Kim in sod., 1999; Gao in sod., 2011). Morebitno encimsko razgradnjo smo preverjali v gojišču M9 z in brez dodane glukoze ter z 1 % HEC. Rezultati (Slika 9) kažejo, da bakterija *V. ruber* ne razgradi HEC, saj ne pride do statistično signifikantne spremembe v koncentraciji redukcijskih koncev (p -vrednost = 0,21), ki odražajo stopnjo degradiranosti polimerov. V primeru bakterijske rasti z dodano glukozo pride do padca koncentracije redukcijskih koncev, iz česar lahko sklepamo, da se je vsa

glukoza porabila v 24 urah bakterijske rasti, vendar pa ni prišlo do razgradnje HEC, saj je končna koncentracija redukcijskih sladkorjev enaka kot v gojišču, v katerem je prisotna le hidroksietil celuloza (Slika 9). Odsotnost sprememb koncentracije redukcijskih koncev v gojišču M9 z 1 % HEC in brez glukoze kaže, da encimska razgradnja HEC v teh pogojih ne poteče.

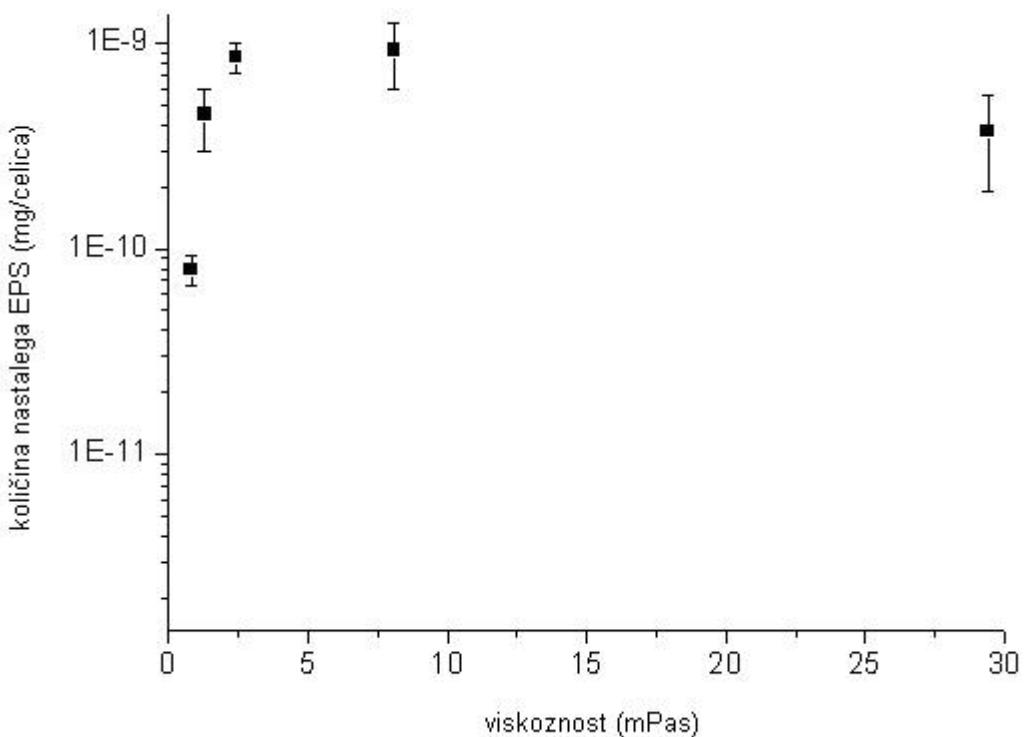


Slika 9: Koncentracija redukcijskih koncev v gojišču M9 z 1 % HEC brez (črni kvadratki) in z 10 g/L glukozo (beli kvadratki) brez, na začetku in na koncu inkubacije z bakterijo *V. ruber*. Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n = 4$).

Figure 9: Reducing sugar concentration in M9 medium with 1 % HEC (black squares) and 10 g/L glucose (white squares) without, in the beginning and in the end of incubation with *V. ruber*. Results are shown as averages and standard deviations ($n = 4$).

Na reologijo polimerov lahko vplivajo tudi druge majhne molekule kot so monosaharidi (Parker in sod., 1996; Mazurkiewitz in sod., 2001; Chen in Stewart, 2002; Tang in sod., 2005), pa tudi kompleksni zunajcelični polimeri, ki jih proizvajajo bakterije. Zato smo preverili koliko zunajceličnega materiala (EPS) je bakterija *V. ruber* proizvedla pri danih pogojih (Slika 10). Pri viskoznostih višjih od 0,8 mPas je bakterija proizvedla več zunajceličnih polimerov, največ pri 2,4 in 8,0 mPas. Ker se pri teh dveh viskoznostih, kljub enaki koncentraciji nastalega EPS, reologija bakterijskih kultur bistveno razlikuje (Slika 8),

ne moremo trditi, da sinteza in izločanje zunajceličnih polimerov bistveno vpliva na viskoznost gojišč oziroma bakterijskih kultur.



Slika 10: Količina EPS, ki ga je sintetizirala bakterija *V. ruber* do pozne eksponentne faze rasti pri različnih viskoznostih. Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n = 3$).

Figure 10: Amount of EPS produced by *V. ruber* grown at different viscosities to the late exponential growth phase. The values presented are means and standard deviations ($n = 3$).

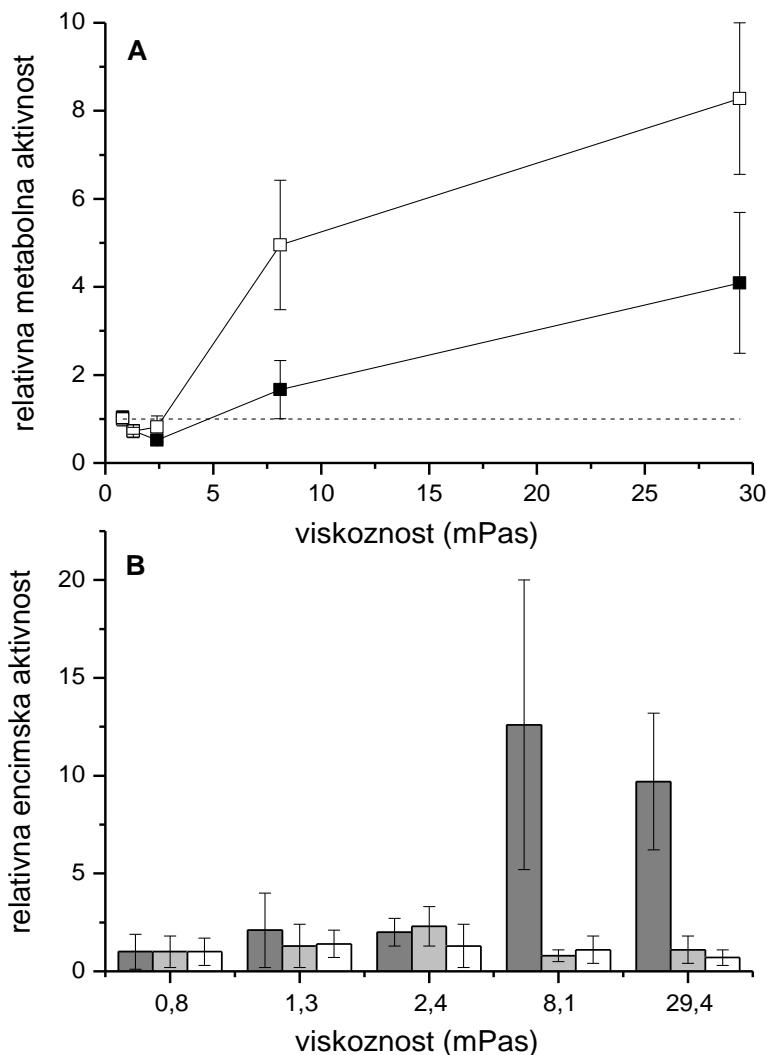
Poleg hitrosti rasti bakterije *V. ruber* pri različnih viskoznostih gojišča M9 smo preverili tudi nosilnost okolja, število in morfologijo celic ter porabo kisika (Preglednica 5). Podobno kot pri hitrosti rasti, tudi v nosilnosti okolja (maksimalni optični gostoti, ki jo bakterija v danih pogojih lahko doseže), statistično signifikantnih razlik ni. Kljub temu se je število celic po 24 urah rasti postopoma zniževalo z višanjem viskoznosti gojišča. Čeprav bi lahko viskoznost medija vplivala tako na velikost celic kot tudi tip običkanosti (Schneider in Doetsch, 1974; Greenberg in Canale-Parola, 1977; Belas in sod., 1986; Ferrero in Lee, 1988; Atsumi in sod., 1996), pa bistvenih morfoloških razlik nismo zaznali. Zanimivo je, da so celice pri rasti porabile več kisika pri višjih viskoznostih (p-vrednosti med 0,0033 in 0,0002), kar nakazuje, da je njihova metabolna aktivnost spremenjena.

Preglednica 5: **Poraba kisika, CFU vrednosti, velikost celic, nosilnost okolja in tip običkanosti bakterije *V. ruber* gojene pri različnih viskoznostih.** Podatki so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n > 3$).
Table 5: Oxygen consumption, CFU values, cell size, carrying capacity and the type of flagellum for *V. ruber* grown at different viscosities. Data are shown as averages and standard deviations ($n > 3$).

| Viskoznost (mPas) | Poraba kisika (mg/L) | Končni CFU/mL x 10^8 | Velikost celic (μm) | | Nosilnost okolja | Biček |
|----------------------|----------------------------|------------------------------|---------------------|---------------|---------------------|---------|
| | | | dolžina | širina | | |
| 0,8 | $3,92 \pm 0,02$ | $8,2 \pm 0,5$ | $2,4 \pm 0,2$ | $0,9 \pm 0,1$ | $2,13 \pm 0,07$ | Polarni |
| 1,3 | $4,05 \pm 0,03$ | $6,9 \pm 0,4$ | $2,5 \pm 0,1$ | $0,9 \pm 0,1$ | $2,00 \pm 0,08$ | Polarni |
| 2,4 | $4,15 \pm 0,02$ | $4,6 \pm 0,9$ | $2,4 \pm 0,1$ | $0,9 \pm 0,1$ | $2,01 \pm 0,08$ | Polarni |
| 8,1 | $4,09 \pm 0,01$ | $4,8 \pm 0,2$ | $2,5 \pm 0,1$ | $0,9 \pm 0,1$ | $2,20 \pm 0,05$ | Polarni |
| 29,4 | $4,20 \pm 0,03$ | $3,2 \pm 0,2$ | $2,5 \pm 0,1$ | $0,9 \pm 0,1$ | $2,10 \pm 0,05$ | Polarni |

4.2.1.2 Metabolna aktivnost

Kot kažejo rezultati predstavljeni na Sliki 11, se znotrajcelična metabolna aktivnost bakterije *V. ruber* med posameznimi viskoznostmi gojišč razlikuje. Celokupna dehidrogenazna aktivnost pri najvišji viskoznosti je bila $1,62 \pm 0,63 \times 10^{-1}$ U mg protein $^{-1}$, kar je približno 4-krat višja aktivnost kot pri najnižji viskoznosti (0,8 mPas). Ti rezultati korelirajo z rezultati hitrosti dihanja (Slika 11A). Pretok ogljika skozi centralne metabolne poti smo določali preko aktivnosti izbranih glikolitičnih encimov, kot so glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (GPD), fosfofruktokinaza (FFK) in piruvat kinaza (PK). Tako kot pri celokupni dehidrogenazni aktivnosti se je tudi aktivnost encima GPD zvišala pri višjih viskoznostih, pri čemer ni bilo statistično signifikantne razlike med obema najvišjima viskoznostima ($p = 0,403$). Aktivnost encima GPD je bila $1,78 \times 10^{-2}$ U mg protein $^{-1}$ pri 0,8 mPas in se je zvišala do $2,40 \times 10^{-1}$ U mg protein $^{-1}$ pri 29,4 mPas ($p = 0,012$). Aktivnost encimov FFK in PK se ni spremenjala med posameznimi viskoznostmi (pvrednosti med 0,098 in 0,981). Pri najnižji viskoznosti je bila aktivnost encima FFK $6,51 \times 10^{-3}$ U mg protein $^{-1}$, medtem ko je bila aktivnost encima PK $9,30 \times 10^{-2}$ U mg protein $^{-1}$.



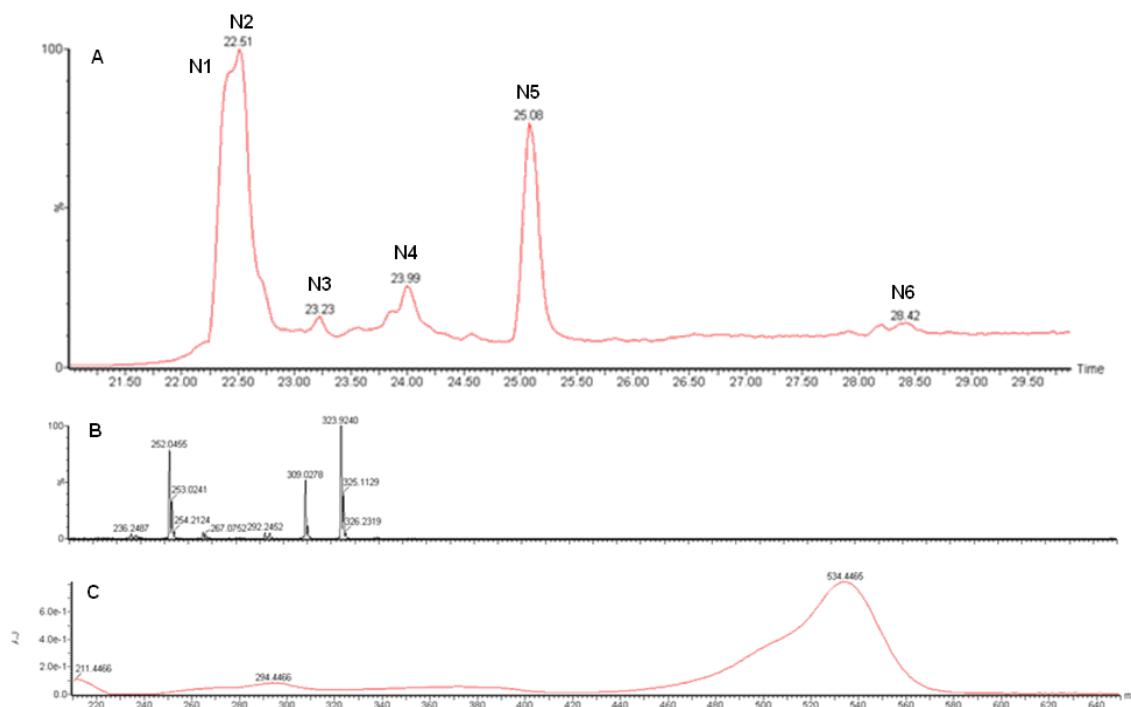
Slika 11: Metabolna aktivnost bakterije *V. ruber* gojene pri različnih viskoznostih minimalnega gojišča M9. Relativna hitrost respiracije (beli simboli) in celokupna dehidrogenazna aktivnost (temni simboli) bakterije *V. ruber* sta prikazani v delu A. Rezultati so predstavljeni kot povprečja in standardni odkloni ($n = 5$). Aktivnost glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (temno sivi stolpci), fosfofruktokinaze (svetlo sivi stolci) in piruvat kinaze (beli stolci) normalizirana na encimsko aktivnost pri 0,8 mPas je prikazana v delu B. Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n = 3$).

Figure 11: Metabolism of *V. ruber* grown at different viscosities of minimal M9 medium. Relative respiration rate (open symbols) and dehydrogenase activity (filled symbols) of *V. ruber* are shown in panel A. The values presented are means and standard deviations ($n = 5$). The dashed line represents metabolic activity in M9 medium. Activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase (dark grey columns), phosphofructokinase (light grey columns) and pyruvate kinase (white columns) relative to the basal enzyme activity at 0,8 mPas are shown in panel B. The values presented are means and standard deviations ($n = 3$).

4.2.1.3 Sekundarni metabolizem – sinteza pigmenta

4.2.1.3.1 Karakterizacija prodigiozinu podobnega pigmenta

Rdeči pigment, ki ga proizvaja bakterija *V. ruber*, smo kemično in strukturno karakterizirali z masno sprektralno spektroskopijo po predhodnem čiščenju s tekočinsko kromatografijo (Alihosseini in sod., 2008). Na podlagi prej objavljenih rezultatov spektra pigmenta in njegovega obnašanja pri spremembah pH vrednosti smo predpostavili, da bakterija *V. ruber* proizvaja pigment prodigiozin (Štraser, 2008). LC/MS rezultati kažejo, da ekstrakt pigmenta bakterije *V. ruber* vsebuje šest različnih komponent, med katerimi so štiri pigmentirane (Slika 12). Komponenti N1 in N2 imata maksimalno absorpcijo pri 534 nm in molekulsko maso 323 Da (starševski ion m/z 324). Fragmentacijski vzorec prikazuje večje fragmente – ione pri m/z 252, 293 in 309, kar odgovarja alkilni verigi, metoksilni skupini in metilni skupini (Alihosseini in sod., 2008). Primerjava naših rezultatov s prej znanimi podatki o prodigiozinu potrjuje hipotezo, da sta večinski komponenti ekstrakta izomeri pigmenta prodigiozina (2-metil-3-pentil-prodiginin) (Alihosseini in sod., 2008).



Slika 12: Skupni ionski kromatogram metanolnega ekstrakta pigmenta iz bakterije *V. ruber* (A). LC/MS (B) in UV-VIS (C) spekter komponent ekstrakta N1 in N2.

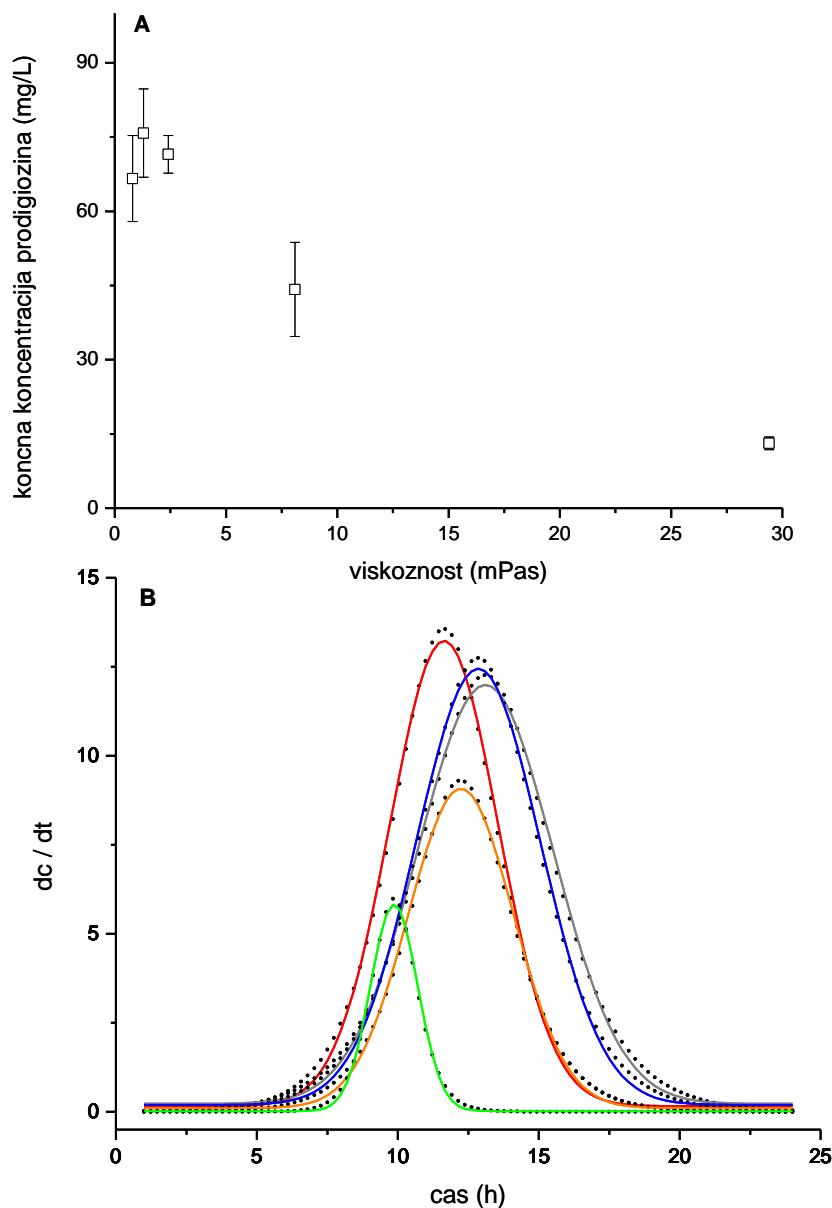
Figure 12: Panel A represents total ion chromatograph for the methanol extract from *V. ruber*. Panels B in C show ESI-MS/MS in UV-VIS spectra of extract components N1 in N2, respectively.

Komponenta metanolnega ekstrakta pigmenta N3 (Priloga B) ima maksimalno absorpcijo pri 534,5 nm, njena molekulska masa pa je 352 Da (starševski ion pri m/z 353) in je najverjetneje heptil prodigiozin (2-metil-3-heptil-prodiginin) (Alihosseini in sod., 2008). Četrta komponenta ekstrakta N4 (Priloga C) ima maksimalno absorpcijo pri 501 nm in molekulsko maso 309 Da (starševski ion pri m/z 310), kar nakazuje, da je ta komponenta norprodigiozin (2-metil-3-butil-prodiginin) (Alihosseini in sod., 2008). Potrditev, da so komponente ekstrakta z masami 323 Da, 352 Da in 309 Da res prodigiozin, heptil prodigiozin in norprodigiozin, so bile opravljene z NMR analizo (Alihosseini in sod., 2008). Metanolni ekstrakt vsebuje še dve nepigmentirani komponenti (N5 in N6) (Slika 12), verjetno kislini, ki jih nismo nadalje analizirali. Ker je čistost ekstrakta prodigiozina višja od 90 % ter heptilprodigiozin in norprodigiosin predstavljata manjšinsko frakcijo, lahko rdeči pigment, ki ga proizvaja bakterija *V. ruber*, obravnamo kot prodigiozin.

4.2.1.3.2 Dinamika pigmentacije

Količina prodigiozina, ki ga je bakterija *V. ruber* proizvedla v 24 urah rasti v minimalnem M9 gojišču z različnimi viskoznostmi, je prikazana na Sliki 13A. Ko je bila viskoznost gojišča manjša ali enaka 2,4 mPas, bistvenega vpliva na sintezo pigmenta ni bilo (p-vrednosti med 0,27 in 0,48). Koncentracija nastalega prodigiozina je bila med 70 in 75 mg/l. V primeru povišane viskoznosti (8,0 in 29,4 mPas) je bakterija *V. ruber* proizvedla manj prodigiozina. Na primer, pri viskoznosti 29,4 mPas je bilo približno 5-krat manj pigmenta kot pri najnižji viskoznosti.

Viskoznost gojišča ni imela vpliva le na končno koncentracijo nastalega prodigiozina, ampak tudi na dinamiko sinteze le-tega (Slika 13B, Preglednici 6 in 7). Pri najnižji viskoznosti (0,8 mPas) se je sinteza prodigiozina začela po približno 5,5 urah rasti in se je ustavila po približno 16 urah rasti. Z višanjem viskoznosti se je začetek sinteze pigmenta premaknil proti daljšim časom rasti. Pri viskoznosti 29,4 mPas se je tako pigmentacija celic začela šele po 7,5 urah rasti, končala pa že po 12,5 urah. Viskoznost medija je bistveno vplivala na sekundarni metabolizem bakterije *V. ruber*.



Slika 13: Sinteza prodigiozina pri bakteriji *V. ruber* gojeni pri različnih viskoznostih. Koncentracija prodigiozina po 24 urah bakterijske rasti je prikazana v delu A. Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n = 3$). Dinamika sinteze prodigiozina je prikazana v delu B. Pike predstavljajo prvi odvod koncentracije prodigiozina glede na čas inkubacije (dc/dt), ki jim je nalegana Gaussova porazdelitev (črte). Rezultati so prikazani kot povprečja treh koncentracij pigmenta v vsakem času ekstrakcije. Legenda: rdeč črta – 0,8 mPas, siva črta – 1,3 mPas, modra črta – 2,4 mPas, oranžna črta – 8,1 mPas, zelena črta – 29,4 mPas.

Figure 13: **Prodigiosin production by *V. ruber* at different viscosities.** Prodigiosin concentration after 24 hours of bacterial growth is shown in panel A. The values presented are means and standard deviations ($n = 3$). Dynamics of prodigiosin production are presented in panel B. The dots represent the first derivative of prodigiosin concentration over time of incubation (dc/dt) and were fitted with Gaussian distribution (lines). The data presented are means of three pigment concentrations at each time of extraction. Legend: red line – 0,8 mPas, grey line – 1,3 mPas, blue line – 2,4 mPas, orange line – 8,1 mPas, green line – 29,4 mPas.

Kot je prikazano v preglednici 6, je majhno zvišanje viskoznosti iz 0,8 na 1,3 mPas povzročilo podaljšanje tako trajanja intenzivne pigmentacije kot tudi čas, pri katerem smo izmerili maksimalno produkcijo prodigiozina. Z nadaljnjam višanjem viskoznosti se je čas maksimalne produkcije krajsal. Interval intenzivne sinteze prodigiozina se je z višanjem viskoznosti najprej podaljšal, nato pa bistveno skrajšal. Sinteza prodigiozina je pri bakterijah uravnana s sistemom za zaznavanje celične gostote (QS) oziroma medcelično komunikacijo (Thomson in sod., 2000; Coulthurst in sod., 2004). Ker je viskoznost tesno povezana z difuzijo molekul, lahko vpliva na potek komunikacije med bakterijskimi celicami (De Kievit in sod., 2001; Liu in sod., 2007; Yang in sod., 2010), in s tem na količino in dinamiko sinteze prodigiozina pri bakteriji *V. ruber* (Borić in sod., 2012). Pri viskoznosti 29,4 mPas se sinteza pigmenta začne najkasneje (2 uri pozneje, Slika 13). To je nasprotuječe prejšnjim objavam, ki pravijo, da se QS aktivira prej, če se zniža difuzija signalnih molekul (De Kievit in sod., 2001; Liu in sod., 2007). Zato smo to v nadaljevanju bolj podrobno raziskali.

Preglednica 6: **Parametri dinamike sinteze prodigiozina pri bakteriji *V. ruber*.** Hitrost sinteze prodigiozina je bila določena z Gaussovo porazdelitvijo ($R^2 > 0,998$). W je širina Gaussove krivulje in X_c je njena maksimalna vrednost. Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n = 3$).

Table 6: **Parameters of prodigiosin production dynamics by *V. ruber*.** The rate of prodigiosin production was approximated with Gaussian distribution ($R^2 > 0,998$). W is the width of the Gaussian curve and X_c is the maximal value of the Gaussian curve. The values presented are means and standard deviations ($n = 3$).

| Viskoznost (mPas) | X_c (h) | W (h) |
|-------------------|------------------|-----------------|
| 0,8 | $11,64 \pm 0,01$ | $3,84 \pm 0,02$ |
| 1,3 | $13,11 \pm 0,01$ | $4,79 \pm 0,03$ |
| 2,4 | $12,85 \pm 0,01$ | $4,39 \pm 0,03$ |
| 8,1 | $12,24 \pm 0,01$ | $3,73 \pm 0,02$ |
| 29,4 | $9,87 \pm 0,01$ | $1,68 \pm 0,01$ |

X_c predstavlja čas maksimalne sinteze prodigiozina, W pa trajanje intenzivne sinteze prodigiozina.
 X_c represents the time of maximal prodigiosin production, W represents the duration of intense prodigiosin production.

4.2.1.4 Medcelična komunikacija in vpliv dostopnosti metabolnih intermediatov na začetek sinteze prodigiozina

Za indukcijo QS je potrebna kritična koncentracija signalnih molekul v lokalnem okolju celic. Koncentracijo signalov smo določili s poročevalskim sevom *V. ruber* RM, ki ni sposoben sinteze prodigiozina (Štraser, 2006). Poročevalski sev se obarva, če mu dodamo izrabljeno gojišče divjega tipa. Ta pojav verjetno ni posledica metabolne izmenjave, saj dodatek različnih intermediatov za sintezo prodigiozina oziraroma celične energije v obliki ATP ne sproži pigmentacije pri sevu *V. ruber* RM. Zato sklepamo, da je pigmentacijski odziv tega seva posledica prisotnosti signalnih molekul. Le-te so najverjetnejše AHL molekule (Drčar, 2010), ni pa izključeno, da so poleg teh prisotne še katere druge (Krajnc, 2011).

Ker je koncentracija signalnih molekul po 5,5 h rasti bakterije *V. ruber* je pod mejo zaznavanja, smo celokupno koncentracijo signalov v odvisnosti od viskoznosti določili po 16 urah rasti (Preglednica 7). Koncentracija QS signalov je pri povišani viskoznosti približno 6-krat višja kot pri najnižji viskoznosti. Kljub večjemu potencialu za produkcijo signalnih molekul pri višji viskoznosti, se indukcija pigmentiranosti zgodi kasneje (Slika 13, Preglednica 7).

Preglednica 7: **Relativna koncentracija signalnih molekul in čas indukcije sinteze prodigiozina pri bakteriji *V. ruber*, ki je rasla pri različnih viskoznostih gojišča M9.** Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n = 3$).

Table 7: **Relative concentration of signal molecules and the timing of induction of prodigiosin synthesis by *V. ruber* grown at different medium viscosities.** Data are presented as averages and standard deviations ($n = 3$).

| Viskoznost (mPas) | Čas indukcije sinteze prodigiozina (h) | Relativna koncentracija signalnih molekul po 16 h rasti |
|----------------------|---|--|
| 0,8 | $5,50 \pm 0,05$ | $1,00 \pm 0,22$ |
| 8,1 | $6,61 \pm 0,20$ | $6,37 \pm 0,81$ |
| 29,4 | $7,64 \pm 0,07$ | $5,85 \pm 0,40$ |

Ker je za potek procesov kontroliranih z medcelično komunikacijo pomembna tudi metabolna aktivnost celic (Francis in Palsson, 1997), smo določili metabolno aktivnost

bakterije *V. ruber* po 5,5 urah rasti (Preglednica 8). Čeprav je bilo število celic primerljivo, je bila celokupna dehidrogenazna aktivnost celic signifikantno (p -vrednost = 0,024) nižja pri 29,4 mPas kot pri 0,8 mPas. Za sintezo prodigiozina celice potrebujejo metabolne intermediate kot so L-prolin, acetat, L-serin, S-adenozilmethionin in 2-oktenal (Qadri in Williams, 1973; Wassermann in sod., 1973; Williamson in sod., 2006). V minimalnem M9 gojišču jih morajo celice narediti *de novo*, kar pomeni, da je sinteza pigmenta energetsko zahteven proces (Trutko in Akimenko, 1989; Starič in sod., 2010; Borić in sod., 2012). Na primer, za sintezo L-prolina iz α -ketoglutarata so potrebne 3 molekule NADPH (Baich, 1969). Skladno z rezultati celokupne dehidrogenazne aktivnosti, koncentracija znotrajceličnega L-prolina pada z višanjem viskoznosti. Pri 29,4 mPas so celice *V. ruber* proizvedle 31 % manj L-prolina na mg suhe teže celic, če primerjamo z najnižjo viskoznostjo (p -vrednost = 5×10^{-6}).

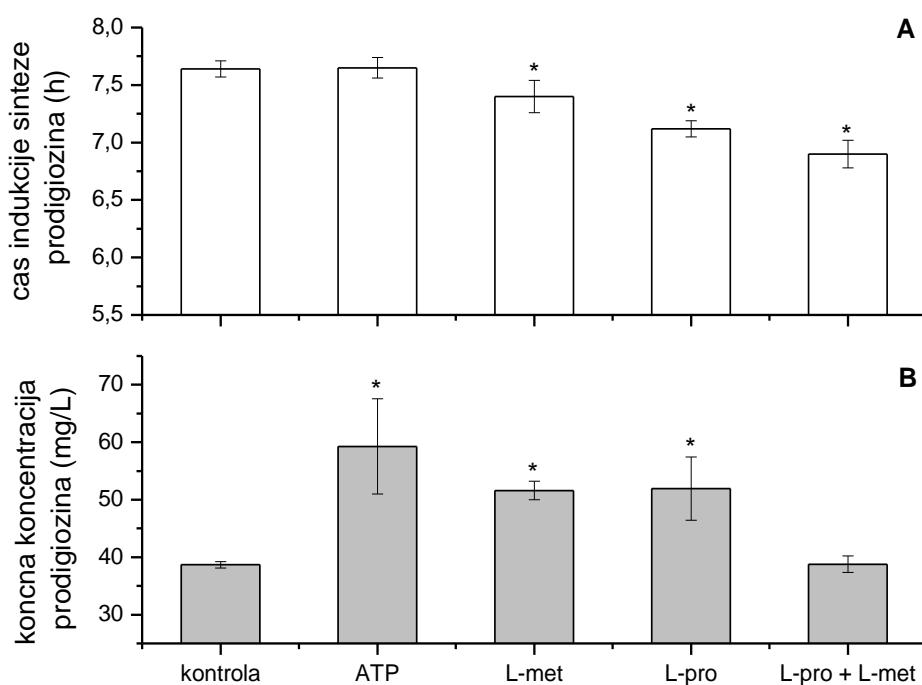
Preglednica 8: **Število celic, koncentracija L-prolina in celokupna dehidrogenazna aktivnost bakterije *V. ruber* pri različnih viskoznostih gojišča po 5,5 urah rasti.** Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n = 3$).

Table 8: **The number of cells, intracellular L-proline concentration and total dehydrogenase activity of *V. ruber* grown at different viscosities after 5,5 hours of incubation just before pigmentation.** Data are presented as averages and standard deviations ($n = 3$).

| Viskoznost (mPas) | Število celic (CFU mL ⁻¹) | Celokupna dehidrogenazna aktivnost (U mg protein ⁻¹) | Koncentracija znotrajceličnega L-prolina (nmol mg suhe teže ⁻¹) |
|----------------------|--|--|---|
| 0,8 | ($2,3 \pm 0,5$) $\times 10^8$ | ($6,4 \pm 1,5$) $\times 10^{-3}$ | $20,5 \pm 1,2$ |
| 8,1 | ($1,9 \pm 0,7$) $\times 10^8$ | ($4,2 \pm 1,0$) $\times 10^{-3}$ | $17,9 \pm 1,1$ |
| 29,4 | ($1,4 \pm 0,1$) $\times 10^8$ | ($1,9 \pm 0,5$) $\times 10^{-3}$ | $14,1 \pm 1,0$ |

Da bi preverili, če pomanjkanje intermediatov za sintezo prodigiozina preprečuje začetek le-te, smo bakteriji *V. ruber* dodali L-prolin in L-metionin (Slika 14). Dodatek omenjenih amino kislin je povzročil, da se je sinteza pigmenta začela znatno prej. Ta efekt je največji, če dodamo oba intermediata skupaj. L-metionin je udeležen pri sintezi S-adenozil metionina (SAM), ki je pomemben kofaktor pri biosintezi 4-metoksi-2,2'-bipiro-5-karbaldehyda (MBC) (Qadri in Williams, 1973; Williamson in sod., 2006), kot tudi pri sintezi AHL molekul (Hanzelka in Greenberg, 1996; Val in Cronan, 1998). L-prolin se vgradi v pirolni obroč med biosintezo MBC (Thomas in sod., 2002; Williamson in sod.,

2006). Zgodnejša sinteza prodigiozina (Slika 14) nakazuje, da je bilo QS signalov v gojišču dovolj, in da je zamik v pigmentaciji verjetno posledica pomanjkanja metabolnih intermediatov zaradi počasnejšega metabolizma pri višjih viskoznostih. Poleg prolina in metionina bi na pigmentacijo lahko vplivali še drugi dejavniki, na primer celična energija (Trutko in Akimenko, 1989; Starič in sod., 2010; Borić in sod., 2012). Kot kažejo rezultati, je dodatek ATP sicer povisal končno koncentracijo proizvedenega prodigiozina, kot so že opazili pri bakteriji *S. marcescens* (Li in sod., 2008), ni pa stimuliral zgodnejše pigmentacije (Slika 14).



Slika 14: Čas indukcije sinteze prodigiozina pri bakteriji *V. ruber* (A) in končna koncentracija prodigiozina po 24 urah rasti v M9 mediju z viskoznostjo 29,4 mPas (B), ko je bil dodan 10 μ M ATP, 2 mM L-metionin, 10 mM L-prolin, ali kombinacija obeh aminokislín po 5,5 urah rasti. Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n = 3$). Zvezdice označujejo statistično signifikantne razlike med vzorci in kontrolami ($\alpha = 0,05$).

Figure 14: Time of induction of prodigiosin synthesis by *V. ruber* (Panel A) and final prodigiosin concentration after 24 hours of incubation in minimal M9 growth medium at 29.4 mPas (Panel B), when supplied with 10 μ M ATP, 2 mM L-methionine, 10 mM L-proline, or a combination of both amino acids after 5,5 h of bacterial growth. Data are shown as averages and standard deviations ($n = 3$). Asterisks represent statistically significant results compared to control ($\alpha = 0,05$).

Dinamika izražanja genov za določeno bakterijsko obnašanje je kritična za preživetje (Chugani in sod., 2001; Rasmussen in Søgaard-Andersen, 2003; Veening in sod., 2006). Prezgodnja sinteza prodigiozina, ko v celici ni dovolj energije ali metabolnih intermediatov, bi lahko povzročila nepotrebne energetske vložke in znižala fitness bakterije. Bakterijski fitnes smo preverili tako, da smo stimulirali pigmentacijo z dodatkom L-prolina in L-metionina. Prezgodaj pigmentirane celice so imele nižji fitness kot kontrolne celice ($6,66 \pm 0,47$ in $7,98 \pm 0,61$ (p-vrednost = 0,041)).

4.2.2 Viskoznost v kombinaciji z izbranimi dejavniki okolja

Viskoznost kot dejavnik okolja smo kombinirali tudi z nekaterimi drugimi dejavniki, ki so bistveni za delovanje bakterije *V. ruber* v njenem naravnem okolju. Izbrali smo temperaturo, slanost in UV sevanje. Naša hipoteza je bila, da je vpliv viskoznosti na fiziološko stanje bakterije odvisen od ostalih dejavnikov okolja. Natančneje, da:

- neoptimalna slanost in višja temperatura skupaj s povišano viskoznostjo predstavljata za bakterijo večji stres kot povišana viskoznost sama,
- prodigiozin zaradi absorpcije v UV spektru ščiti celice pred UV stresom,
- letalni učinki UV sevanja na bakterijo *V. ruber* se z višanjem viskoznosti manjšajo.

Ker bakterija *V. ruber* pri neoptimalni slanosti in temperaturi zelo slabo in počasi raste v gojišču M9 z 10 g/L glukoze, smo te poskuse izvedli le v kompleksnem PKS gojišču.

4.2.2.1 Vpliv gojišča in viskoznosti

Podobno kot v minimalnem M9 gojišču je tudi v kompleksnem PKS gojišču bakterija *V. ruber* znižala viskoznost rastnega medija, ko je bila le-ta nad 1,3 mPas (Preglednica 9). Hitrost rasti se je z višanjem viskoznosti kompleksnega PKS gojišča postopoma nižala (Preglednica 9), česar pa nismo opazili v minimalnem gojišču (Slika 7). V slednjem je bakterija *V. ruber* bistveno spremenila metabolizem (Slika 11), medtem ko v gojišču PKS nismo zaznali statistično značilnih razlik v celokupni dehidrogenazni aktivnosti ter hitrosti respiracije (Preglednica 9). Če primerjamo hitrost rasti in intenzivnost metabolizma bakterije *V. ruber* v obeh skrajnih viskoznostih gojišča PKS vidimo, da celice z enako metabolno aktivnostjo (p-vrednost 0,151 za hitrost respiracije oziroma 0,477 za celokupno

dehidrogenazno aktivnost) rastejo bistveno počasneje (p -vrednost = 0,0009). Rezultati nakazujejo, da ima ne glede na tip gojišča povišana viskoznost signifikantnen vpliv na bakterijske celice. Poleg tega se zdi, da imamo pri viskoznosti 1,3 mPas še en način odziva, in sicer enako hitrost rasti ter nižjo metabolno aktivnost metabolizma glede na najnižjo viskoznosti.

Preglednica 9: **Hitrost rasti in metabolna aktivnost pri bakteriji *V. ruber* gojeni v gojišču PKS s 3 % (w/V) NaCl z različno viskoznostjo pri temperaturi 28 °C.** Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n = 5$). Relativne vrednosti so prikazane glede na aktivnost pri najnižji viskoznosti.

Table 9: **Growth rate and metabolic activity of *V. ruber* grown in PYE with 3 % NaCl with different viscosities and at 28 °C.** Results are shown as averages and standard deviations ($n = 5$). Relative values are calculated to the lowest viscosity.

| Viskoznost (mPas) | Viskoznost kultur (mPas) | Hitrost rasti (h^{-1}) | Relativna hitrost respiracije | Relativna celokupna dehidrogenazna aktivnost |
|----------------------|--------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|--|
| 0,8 | 0,8 ± 0,1 | 0,83 ± 0,02 | 1,00 ± 0,69 | 1,00 ± 0,03 |
| 1,3 | 1,1 ± 0,2 | 0,84 ± 0,02 | 0,38 ± 0,09 | 0,65 ± 0,13 |
| 2,4 | 1,9 ± 0,2 | 0,77 ± 0,02 | 1,70 ± 1,44 | 0,50 ± 0,12 |
| 8,0 | 3,7 ± 0,4 | 0,76 ± 0,02 | 1,15 ± 0,93 | 0,71 ± 0,14 |
| 29,4 | 13,3 ± 2,5 | 0,68 ± 0,02 | 0,56 ± 0,45 | 0,99 ± 0,27 |

Z višanjem viskoznosti v kompleksnem gojišču PKS se je spremenil tudi sekundarni metabolizem bakterije *V. ruber*. Koncentracija pigmenta po 24 urah rasti je bila pri viskoznosti enaki ali višji od 1,3 mPas glede na 0,8 mPas nižja, vendar pa so celice za sintezo pigmenta pri viskoznostih nad 8,0 mPas porabile več časa (Preglednica 10). Če primerjamo rezultate s pigmentacijo v minimalnem gojišču (Slika 13), vidimo, da je pri nižjih viskoznostih nastalo v M9 gojišču bistveno več pigmenta, kar je skladno z dosedanjimi opažanji (Starič in sod., 2010). Pri visokih viskoznostih smo opazili ravno obraten odziv, saj je bilo pigmenta v gojišču PKS več, trajanje intenzivne sinteze pa je bilo daljše (Preglednici 6 in 10).

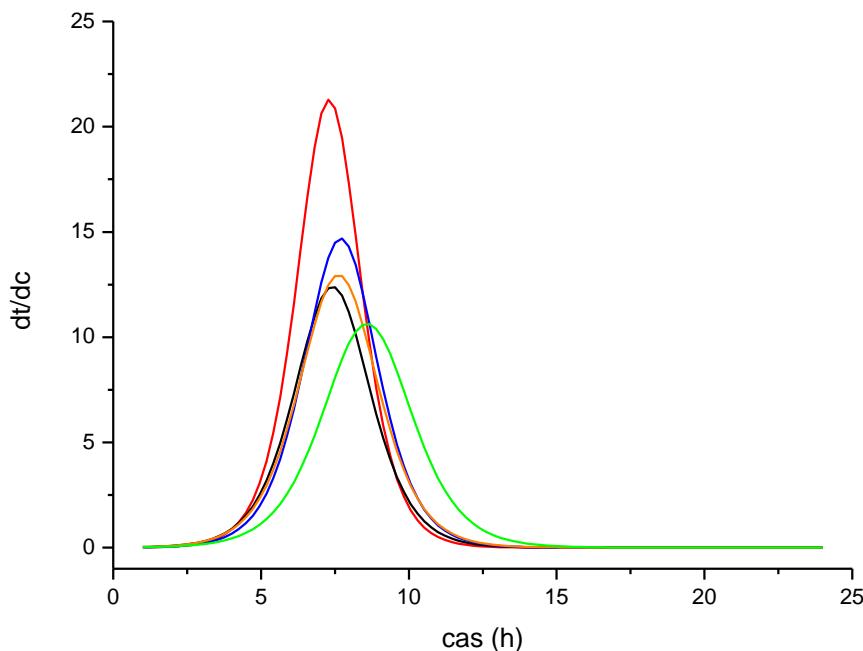
Preglednica 10: **Sinteza prodigiozina pri bakteriji *V. ruber* v gojišču PKS s 3 % (w/V) NaCl z različno viskoznostjo.** Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n = 6$).

Table 10: **Prodigiosin production by *V. ruber* in PYE medium with 3 % NaCl and different viscosities.**

Results are shown as averages and standard deviations ($n = 6$).

| Viskoznost (mPas) | Končna koncentracija prodigiozina (mg/L) | Čas makismalne sinteze prodigiozina (h) | Trajanje intenzivne sinteze prodigiozina (h) |
|----------------------|---|--|---|
| 0,8 | $63,80 \pm 2,17$ | $7,30 \pm 0,11$ | $2,29 \pm 0,01$ |
| 1,3 | $42,92 \pm 4,43$ | $7,42 \pm 0,10$ | $2,70 \pm 0,02$ |
| 2,4 | $47,92 \pm 2,34$ | $7,00 \pm 0,05$ | $2,61 \pm 0,02$ |
| 8,0 | $45,86 \pm 2,79$ | $7,62 \pm 0,01$ | $2,80 \pm 0,02$ |
| 29,4 | $43,25 \pm 1,00$ | $8,59 \pm 0,06$ | $3,17 \pm 0,02$ |

Rezultati kažejo, da viskoznost ne glede na gojišče vpliva na dinamiko sinteze prodigiozina pri bakteriji *V. ruber*. Čas, ko se celice dosegle maksimalno sintezo prodigiozina se je z višanjem viskoznosti medija daljšal (Slika 15, Preglednica 10), kar smo opazili tudi v minimalnem gojišču z izjemo najvišje viskoznosti. Bakterija *V. ruber* v kompleksom PKS gojišču doseže makismalno sintezo pigmenta približno 4 do 5 ur prej kot v minimalnem M9 gojišču. Prav tako se tudi začetek pigmentacije pri vseh viskoznostih zgodi prej v gojišču PKS, vendar pa je tudi v tem gojišču povišana viskoznost povročila zamik v indukciji pigmentacije(Slika 13).



Slika 15: **Dinamika sinteze prodigiozina pri bakteriji *V. ruber* v gojišču PKS s 3 % (w/V) NaCl z različnimi viskoznostmi.** Legenda: 0,8 mPas – rdeča, 1,3 mPas – črna, 2,4 mPas – modra, 8,0 mPas – oranžna, 29,4 mPas – zelena.

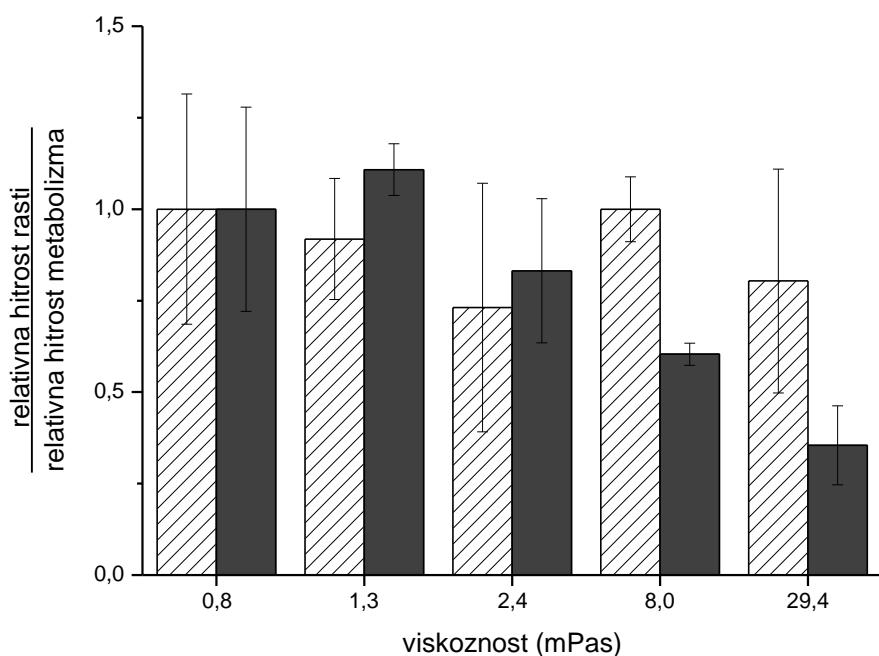
Figure 15: **Prodigiosin synthesis dynamics in *V. ruber* grown in PYE with 3 % NaCl with different viscosities.** Legend: 0,8 mPas – red, 1,3 mPas – black, 2,4 mPas – blue, 8,0 mPas – orange, 29,4 mPas – green.

4.2.2.2 Vpliv temperature in viskoznosti

Bakterijo *V. ruber* smo gojili pri dveh temperaturah – optimalni (28°C) in višji od optimalne (37°C). Poskusili smo tudi pri nižji temperaturi (15°C), vendar pa je bakterija *V. ruber* izredno slabo in počasi rasla, zato nadaljnji eksperimentov nismo izvajali. Izrazito nizka hitrost rasti pri nizkih temperaturah je bila opažena že prej (Danevčič, 2006).

Pri povišani temperaturi gojenja celic je bakterija *V. ruber* tudi znižala začetno viskoznost medija, ko je bila le-ta višja od 2,4 mPas. Viskoznost kultur se je iz začetnih 8,0 in 29,4 mPas znižala na 5,4 oziroma 13,6 mPas po 24 urah bakterijske rasti, kar ni statistično značilno od rezultatov pri temperaturi 28°C . Viskoznost sterilnih gojišč in bakterijskih

kultur pri nižjih koncentracijah HEC (0 do 0,25 %) in povišani temperaturi, se ni bistveno razlikovala. Hitrost rasti se ni bistveno spremajala, saj je znašala pri vseh viskoznostih med 1,1 in 1,3 h⁻¹ (Priloga D1). Hitrost respiracije pri najvišji viskozniosti je bila $8,9 \times 10^{-12}$ mL CO₂ h⁻¹ celica⁻¹, kar je približno 2-krat višje kot pri najnižji viskozniosti. Iz hitrosti rasti in hitrosti respiracije (Priloga D1), smo preračunali učinkovitost delovanja celic. Le-ta je količnik med relativno hitrostjo rasti in relativno hitrostjo metabolizma (respiracije), pri čemer sta bila oba parametra normirana na najnižjo viskoznost. S tem kombiniranim parametrom opišemo kako stresno je okolje za rast celic. Nižje kot je razmerje, bolj so celice v stresu, saj morajo biti metabolno aktivnejše da vzdržujejo enako rast. Pri temperaturi 28 °C ni signifikantnih razlik v učinkovitosti delovanja pri posameznih viskoznostih (Slika 16; črtkani stolpci). Pri povišani temperaturi se učinkovitost delovanja zniža, ko je viskoznost rastnega medija 8,0 mPas ali več. Takrat pada na 0,6 oziroma 0,4 začetne učinkovitosti, kar je signifikantno nižje (p-vrednosti sta 0,002 in 0,02).

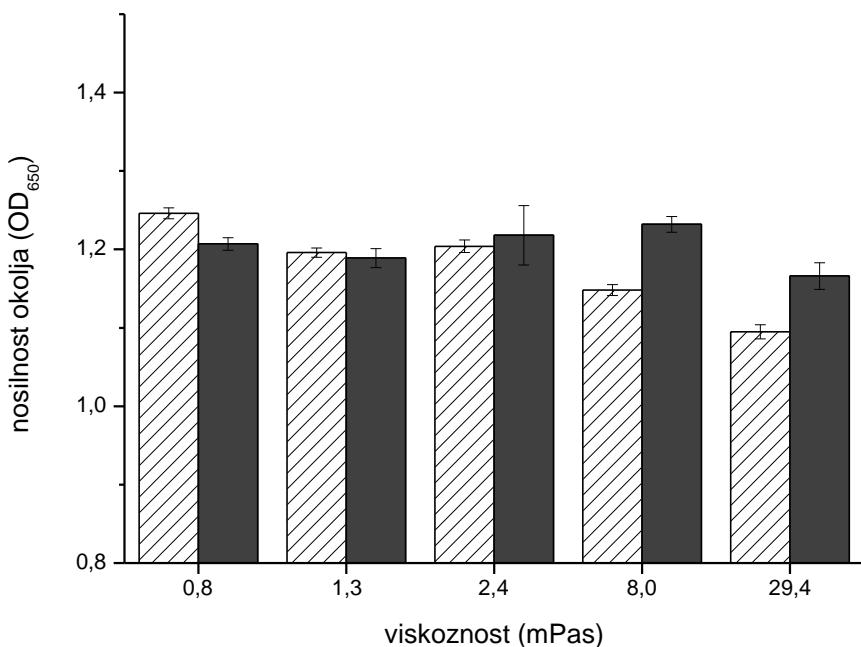


Slika 16: Učinkovitost delovanja bakterije *V. ruber* gojene pri različnih temperaturah (28 °C – beli šrafirani stolci; 37 °C – temno sivi stolci) ter različnih viskoznostih gojišča PKE in konstantni slanosti (3 % NaCl). Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n \geq 3$).

Figure 16: Growth efficiency of *V. ruber* grown at different temperatures (28 °C – white hatched columns; 37 °C – dark grey columns) and different viscosities of PYE growth medium supplied with 3 % NaCl. Results are shown as averages and standard deviations ($n \geq 3$).

Če učinkovitost delovanja celic ne normaliziramo na najnižjo viskoznost pri posamezni temperaturi, dobimo, da je pri najnižji viskoznosti učinkovitost delovanja pri 28 °C približno 15-krat, pri najvišji viskoznosti pa celo 30-krat višja kot pri 37 °C. Ti rezultati kažejo, da povišana temperatura v kombinaciji s povišano viskoznostjo bolj stresno vpliva na celica kot samo povišana viskoznost.

Rezultati nosilnosti okolja, ki nam pove kakšna je maksimalna optična gostota, ki jo celice v danih pogojih lahko dosežejo, so prikazani na sliki 17. Pri temperaturi 28 °C nosilnost okolja pada z višanjem viskoznosti. Pri povišani temperaturi se nosilnost okolja ohranja, razen pri najvišji viskoznosti (29,4 mPas), ko nosilnost okolja rahlo pade (p-vrednost 0,019).



Slika 17: Nosilnost okolja bakterije *V. ruber* gojene pri različnih temperaturah (28 °C – beli šrafirani stolpci; 37 °C – temno sivi stolci) ter različnih viskoznostih gojišča PKE in konstantni slanosti. Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n \geq 3$).

Figure 17: Carrying capacity of *V. ruber* grown at different temperatures (28 °C – white hatched columns; 37 °C – dark grey columns) and different viscosities of PYE growth medium supplied with 3 % NaCl. Results are shown as averages and standard deviations ($n \geq 3$).

V primerjavi s koncentracijo proizvedenega prodigiozina pri optimalnih pogojih je pri povišani temperaturi pigmenta bistveno manj (Preglednica 11), približno 6 do 7-krat, kar je skladno z dosedanjimi rezultati (Danevčič, 2006; Starič in sod., 2010). Tudi pri teh pogojih pa viskoznost negativno vpliva na količino nastalega prodigiozina, saj ga je z višanjem viskoznosti manj.

Preglednica 11: **Koncentracija nastalega prodigiozina v kulturah bakterije *V. ruber* gojenih v gojišču PKS 3 % NaCl in temperaturi 28 oziroma 37 °C.** Rezultati so podani kot povprečja in standardni odkloni ($n = 3$).

Table 11: **Prodigiosin production by *V. ruber* grown at 28 and 37 °C in PYE medium supplied with 3 % NaCl.** Results are shown as averages and standard deviations ($n = 3$).

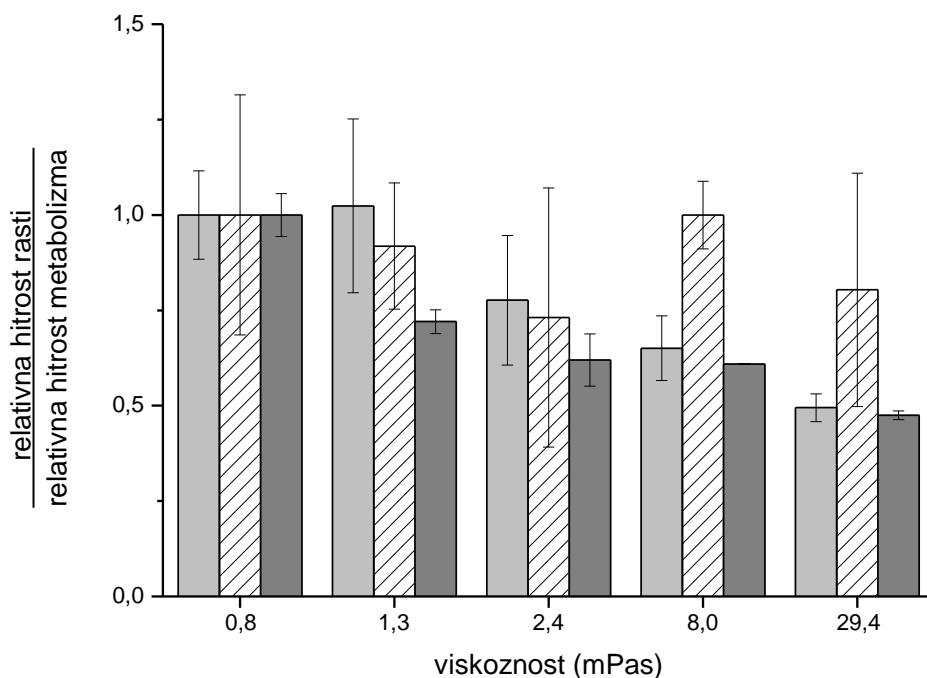
| Viskoznost (mPas) | Končna koncentracija prodigiozina (mg/L) | |
|-------------------|--|--------------|
| | T = 28 °C * | T = 37 °C |
| 0,8 | 63,80 ± 2,17 | 11,35 ± 0,24 |
| 1,3 | 42,92 ± 4,43 | 9,06 ± 0,41 |
| 2,4 | 47,92 ± 2,34 | 5,45 ± 0,82 |
| 8,0 | 45,86 ± 2,79 | 6,86 ± 2,11 |
| 29,4 | 43,25 ± 1,00 | 6,04 ± 1,28 |

* podatki so enaki kot v preglednici 10.

4.2.2.3 Vpliv slanosti in viskoznosti

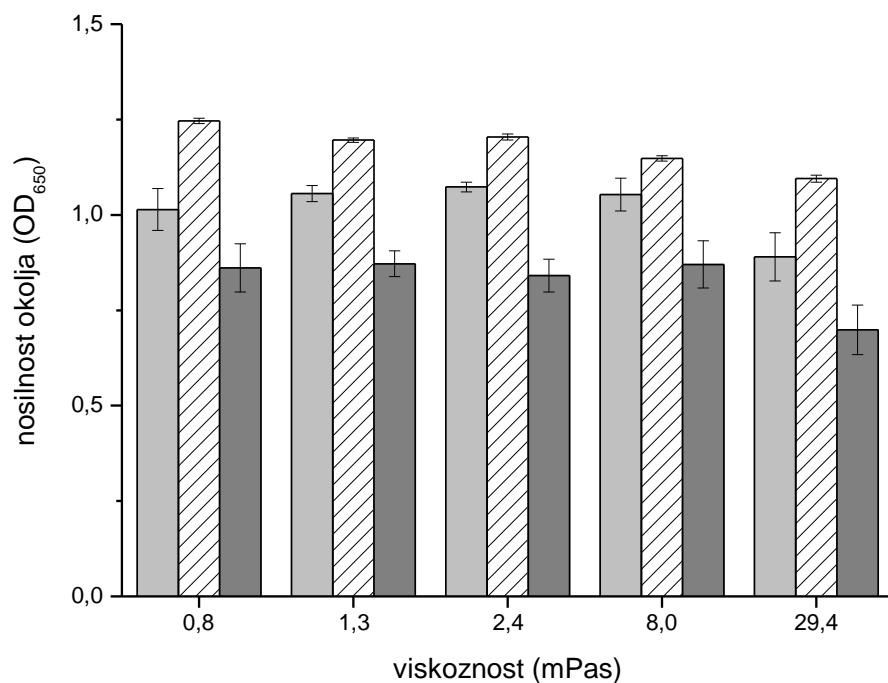
Bakterijo *V. ruber* smo gojili pri treh različnih slanostih – optimalni (3 % NaCl), nižji (0,5 % NaCl) in višji (10 % NaCl) ter optimalni temperaturi (28 °C). Hitrost rasti in metabolizma, na podlagi katerih je izračunana učinkovitost delovanja celic, so podane v Prilogi D2. Viskoznost pri optimalni slanosti (3 % NaCl) nima značilnega vpliva na učinkovitost delovanja celic (p-vrednosti med 0,37 in 0,99), čeprav je nakazan trend padanja (Slika 18). Če primerjamo rezultate učinkovitosti delovanja celic gojenih pri nizki slanosti vidimo, da v rangu viskoznosti od 0,8 do 2,4 mPas ni bistvenih razlik. Pri viskoznosti 8,0 mPas ali višji pa smo opazili signifikantne razlike v učinkovitosti delovanja (p-vrednosti med 0,0135 in 0,0001). V kolikor rezultate ne normaliziramo, je pri najnižji viskoznosti učinkovitost delovanja celic pri 0,5 % NaCl 40-krat nižja, pri 10 % NaCl pa

8,5-krat nižja. Razlika se je z višanjem viskoznosti samo še stopnjevala. Pridobljeni rezultati kažejo, da neoptimalna slanost v kombinaciji s povišano viskoznostjo za celice predstavlja višjo stopnjo stresa kot samo povišana viskoznost.



Slika 18: Učinkovitost delovanja bakterije *V. ruber* gojene pri različnih slanostih (0,5 % NaCl – svetlo sivi stolci; 3 % NaCl – beli šrafirani stolci; 10 % NaCl – temno sivi stolci) ter različnih viskoznostih gojišča PKE in konstantni temperaturi. Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n \geq 3$).
Figure 18: Efficiency of *V. ruber* grown at different salinities (0,5 % NaCl – light grey columns; 3 % NaCl – white hatched columns; 10 % NaCl – dark grey columns) and different viscosities of PYE growth medium supplied with 3 % NaCl. Results are shown as averages and standard deviations ($n \geq 3$).

Nosilnost okolja pri različnih slanostih ter viskoznostih medija je prikazana na Sliki 19 in je pri vseh viskoznostih nižja pri obeh neoptimalnih slanostih. V splošnem z višanjem viskoznosti nosilnost okolja pada, vendar pa padec ni izrazit, razen pri najvišji viskoznosti. Nosilnost okolja je najvišja pri optimalni slanosti, medtem ko je najnižja, ko je v gojišču 10 % (w/V) NaCl. Zanimivo je, da bakterija *V. ruber* ima višjo nosilnost okolja pri 0,5 % NaCl kot pri 10 % NaCl, čeprav ni razlik v učinkovitosti delovanja celic med obema neoptimalnima slanostima.



Slika 19: **Nosilnost okolja bakterije *V. ruber* gojene pri različnih slanostih (0,5 % NaCl – svetlo sivi stolpci; 3 % NaCl – beli šrafirani stolpci; 10 % NaCl – temno sivi stolpci) ter različnih viskoznostih gojišča PKE in konstantni temperaturi.** Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n \geq 3$).

Figure 19: **Carrying capacity of *V. ruber* grown at different salinities (0,5 % NaCl – light grey columns; 3 % NaCl – white hatched columns; 10 % NaCl – dark grey columns) and different viscosities of PYE medium at 28 C.** Results are shown as averages and standard deviations ($n \geq 3$).

Pri ekstremnih slanostih je bakterija *V. ruber* proizvedla med 1 in 2 mg/L prodigiozina, kar je bistveno manj kot pri optimalnih pogojih (Danevčič, 2006; Starič in sod., 2010). Spreminjanje viskoznosti medija pri teh pogojih ni pomembno za produkcijo pigmenta, saj ga je tako malo, da ni statistično signifikantnih razlik v količini nastalega pigmenta (Preglednica 12).

Preglednica 12: **Količina nastalega prodigiozina v kulturah bakterije *V. ruber* gojene v gojišču PKS z 0,5 oziroma 10 % NaCl.** Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni (n = 3).

Table 12: **Prodigiosin production by *V. ruber* grown in PYE medium with 0,5 and 10 % NaCl, respectively.** Results are shown as averages and standard deviations (n = 3).

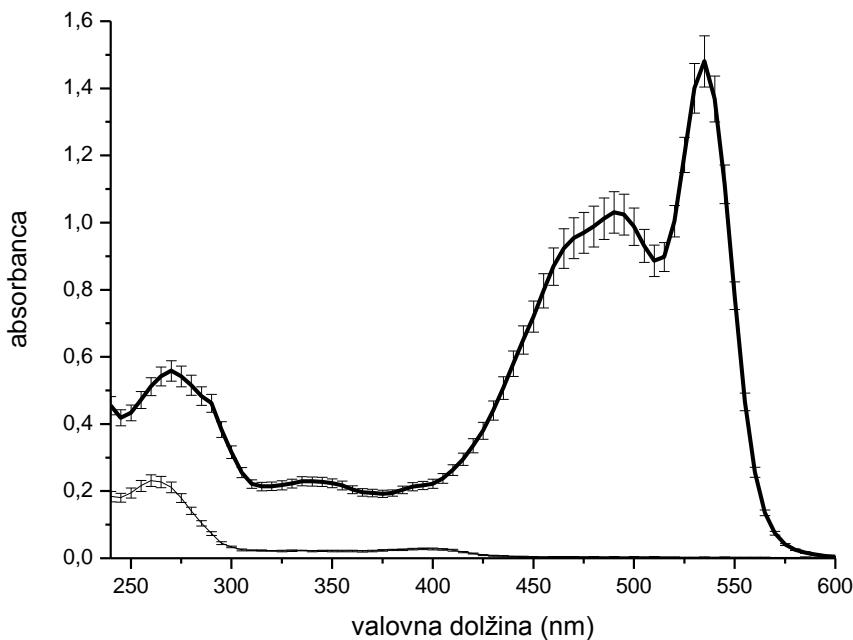
| Viskoznost (mPas) | Koncentracija prodigiozina (mg/L) | | |
|-------------------|-----------------------------------|--------------|-------------|
| | 0,5 % NaCl | 3 % NaCl * | 10 % NaCl |
| 0,8 | 1,58 ± 0,98 | 63,80 ± 2,17 | 0,90 ± 0,37 |
| 1,3 | 1,40 ± 0,71 | 42,92 ± 4,43 | 0,64 ± 0,34 |
| 2,4 | 1,19 ± 0,39 | 47,92 ± 2,34 | 0,64 ± 0,23 |
| 8,0 | 1,72 ± 0,72 | 45,86 ± 2,79 | 0,91 ± 0,11 |
| 29,4 | 2,00 ± 0,54 | 43,25 ± 1,00 | 1,16 ± 0,43 |

* rezultati za slanost 3 % NaCl so enaki kot v Preglednici 10.

4.2.2.4 Vpliv UV sevanja

4.2.2.4.1 Prodigiozin ščiti celice pred UV sevanjem

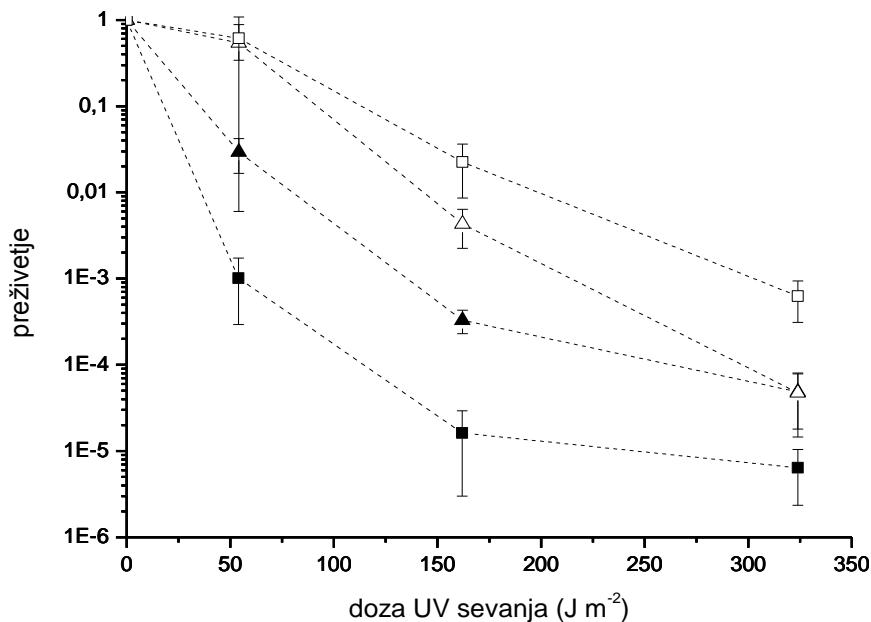
Absorpcijski spekter prodigiozina izoliranega iz divjega tipa bakterije *V. ruber* WT in njene nepigmentirane mutante (*V. ruber* BM) v metanolu je prikazan na Sliki 20. Maksimalna absorpcija prodigiozina je pri 530 nm, medtem ko ekstrakt nepigmentirane mutante nima absorpcije v območju med 400 in 600 nm. Širok pas absorpcije lahko opazimo v UV območju med 300 in 400 nm, ki je zopet značilen le za pigment iz divjega tipa. Tretje območje absorpcije se nahaja v območju med 245 in 300 nm, katerega intenzivnost je pri nepigmentirani mutanti bistveno nižja kot pri divjem tipu bakterije *V. ruber*. Absorpcija v UV območju kaže na možnoUV-zaščitno vlogo pigmenta.



Slika 20: Spekter prodigiozina ekstrahiranega iz bakterije *V. ruber* WT ter spekter ekstrakta iz nepigmentirane mutante bakterije *V. ruber* BM. Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n = 3$).

Figure 20: Absorption spectrum of prodigiosin extracted with methanol from the wild type *V. ruber* (bold solid line) and non-pigmented mutant of *V. ruber* (thin solid line) at room temperature. Data points represent average values and standard deviations ($n = 3$).

Krивulje preživetja izpostavljenosti UV sevanju v različnih fazah rasti bakterije *V. ruber* so podane na Sliki 21. Preživetje celic je definirano kot razmerje med številom celic po obsevanju in številom celic pred obsevanjem. Celice v fazi prilagajanja (lag faza) so najbolj dovzetne za UV stres in ga preživijo v najmanjšem številu. Odpornost proti UV stresu narašča proti stacionarni fazi rasti. Preživetje UV sevanja je odvisno tudi od doze letega, saj se z višanjem prejete doze sevanja, število živih celic bistveno zmanjša (Slika 21). Ta efekt je opazen pri celicah v vseh testiranih fazah rasti.



Slika 21: Krivulja preživetja UV sevanja bakterije *V. ruber* v različnih fazah rasti (faza prilagoditve (črni kvadratki), zgodnja faza logaritemske rasti (črni trikotniki), pozna faza logaritemske rasti (beli trikotniki), stacionarna faza rasti (beli kvadratki). Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n \geq 6$).

Figure 21: Survival curves of the wild type *V. ruber* with increasing intensity of UV stress as a function of bacterial physiological state: lag phase (black squares), early exponential phase (black triangles), late exponential phase (white triangles) and stationary phase (white squares). Data points represent average values and standard deviations ($n \geq 6$).

Preživetje divjega tipa bakterije *V. ruber* smo dodatno opisali tudi s parametrom F₁₀ (doza sevanja, ki vodi do 90 % inaktivacije začetne populacije) (Moeller in sod., 2005) in IK (inaktivacijska konstanta) (Bauermeister in sod., 2009). Slednja podaja naklon krivulj preživetja. Ta dva parametra sta uporabna za primerjavo občutljivosti različnih bakterij na UV sevanje.

Preglednica 13: **Vrednosti F_{10} in IK za bakterijo *V. ruber* WT.** Podatki so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n \geq 6$).

Table 13: **F_{10} and IK values for *V. ruber* WT.** Data represent average values and standard deviations ($n \geq 6$).

| Čas rasti (h) / faza rasti | F_{10} (J/m ²) | IK (m ² /J) · 10 ⁻² |
|----------------------------|------------------------------|---|
| 1 / prilagoditvena | 11,3 ± 2,1 | 6,45 ± 0,56 |
| 3 / prilagoditvena | 12,0 ± 2,0 | 6,49 ± 0,35 |
| 5 / zgodnja eksponentna | 24,3 ± 3,1 | 4,86 ± 0,20 |
| 8 / pozna eksponentna | 80,7 ± 8,1 | 3,23 ± 0,07 |
| 14 / stacionarna | 70,3 ± 16,5 | 2,74 ± 0,22 |
| 24 / stacionarna | 88,3 ± 17,6 | 2,41 ± 0,11 |

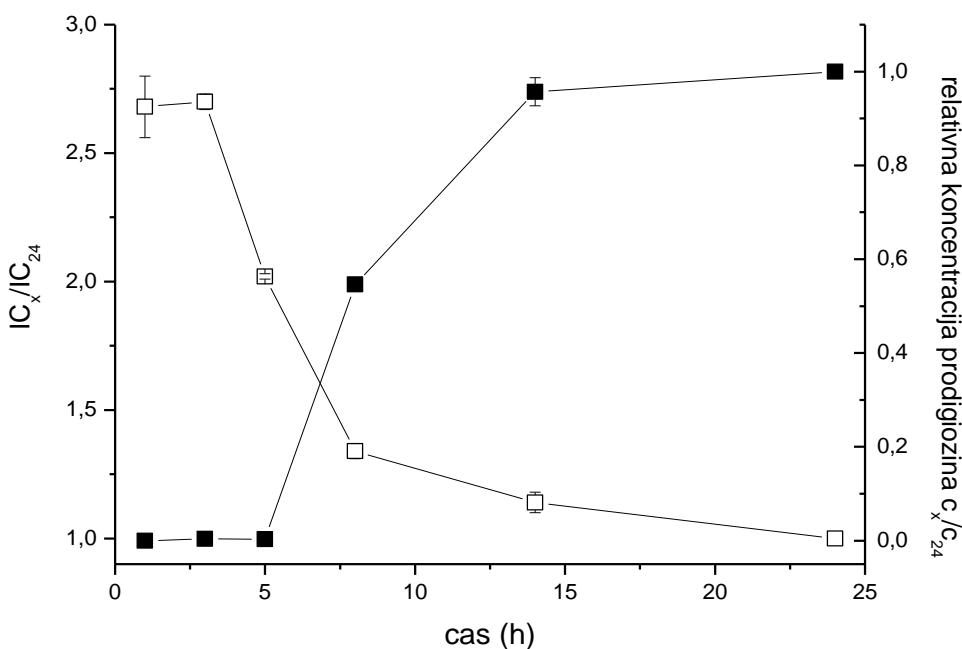
F_{10} = doza UV sevanja (J/m²), ki vodi do inaktivacije 90 % začetnega CFU.

IK = inaktivacijska konstanta (m²/J), določena iz naklona ustrezne krivulje preživetja.

F_{10} = fluence (J/m²) of UVC irradiation leading to a 90% inactivation of initial CFU.

IK = inactivation constant (m²/J), determined from the slope of the respective fluence effect curve.

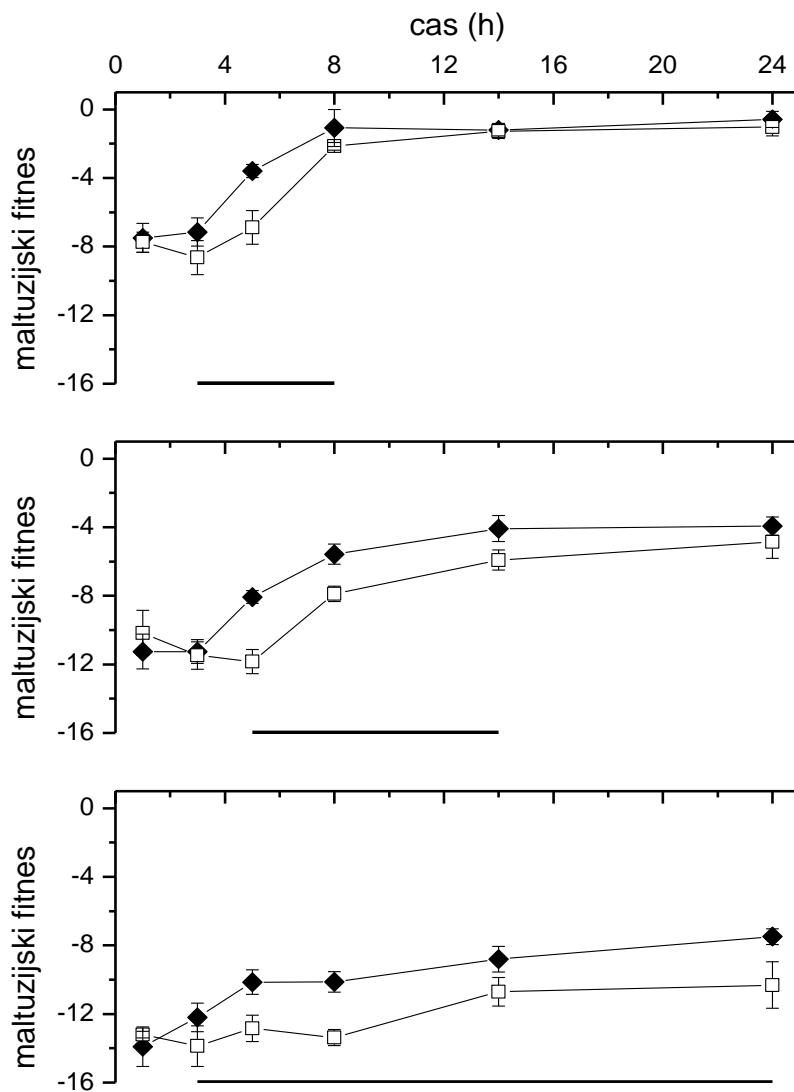
Po izpostavitvi UV sevanju smo opazili dve stanji bakterijske odpornosti: občutljivo stanje (nizek F_{10}) v fazi prilagajanja in v zgodnji eksponentni fazri rasti (1 in 3 ure stare celice) ter stanje odpornosti (visok F_{10}) v pozni eksponentni fazri rasti in stacionarni fazri (celice stare najmanj 5 ur). Hiter preskok med stanjem se zgodi med 5 in 8 uro rasti, kar se ujema z začetkom sinteze prodigiozina (Slika 15, Slika 22). V zgodnjih fazah rasti sinteze prodigiozina ni oziroma je ni možno zaznati.



Slika 22: Relativni koeficient preživetja (beli kvadratki) ter koncentracija prodigiozina (črni kvadratki) v odvisnosti od časa rasti bakterije *V. ruber*. Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n \geq 6$ za koeficient preživetja in $n = 3$ za koncentracijo prodigiozina).

Figure 22: Relative inactivation constant (IC; white squares) and prodigiosin production (black squares) for the wild type *V. ruber* strain grown in PYE medium with 3 % (w/V) NaCl at 28 °C. Data points represent average values and standard deviations ($n \geq 6$ for IC and $n = 3$ for pigment concentration).

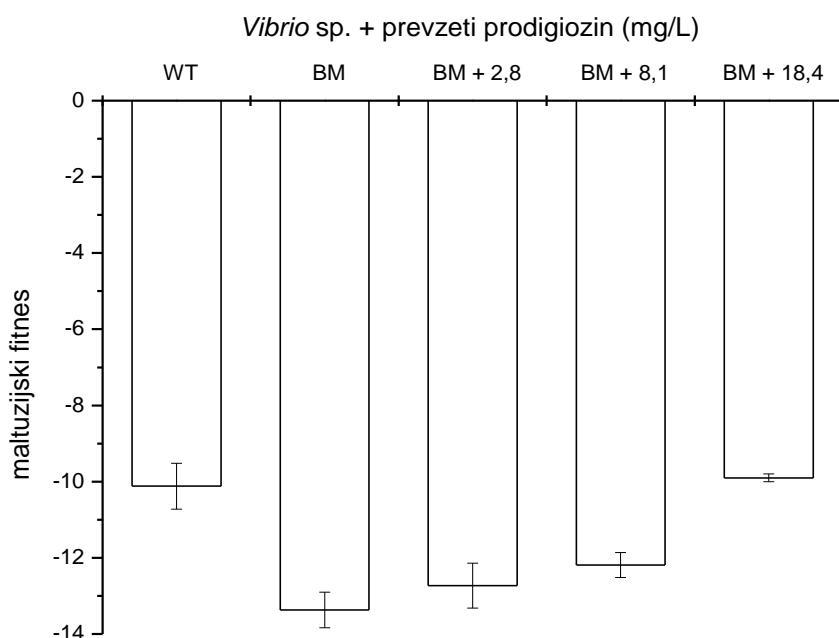
Vpliv pigmentacije na Maltuzijski fitnes z UV obsevanih celic je prikazan na Sliki 23. Odpornost obeh sevov je odvisna od faze rasti (časa inkubacije). Pri nižji dozi UV sevanja (Slika 23A) Maltuzijski fitnes naraste od -8 v fazi prilagajanja do -1 v stacionarni fazi rasti. Čeprav oba seva, tako pigmentirani, kot tudi nepigmentirani, kažeta podoben vzorec odpornosti proti UV sevanju, pa nastopi signifikantna razlika med obema sevoma, ko divji tip začne sintetizirati prodigiozin (okrog 5 ure rasti). Z višanjem doze UV sevanja se časovni interval, v katerem se preživetje obeh sevov signifikantno razlikuje, daljša, kar je nakazano s ravno črto na spodnjem delu grafa. Pri najvišji uporabljeni dozi UV sevanja (Slika 23C) je divji tip bistveno bolj odporen od nepigmentirane mutante, vendar le takrat, ko so celice pigmentirane. Posledično ima divji tip za približno 3 velikostne rede višji Maltuzijski fitnes kot mutanta. To pomeni, da pigmentirane celice približno 1000-krat bolje preživijo višje doze UV sevanja.



Slika 23: **Maltuzijski fitnes bakterij *V. ruber* (črni simboli) in nepigmentirane mutante *V. ruber* (beli simboli) v različnih fazah rasti in po različnih dozah UV sevanja (A – 54 J/m²; B – 162 J/m² in C – 324 J/m²). Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n \geq 6$). Črte prikazujejo statistično signifikantne razlike ($p \leq 0,05$).**

Figure 23: **Malthusian fitness of the wild type *V. ruber* (black symbols) and the non-pigmented mutant (white symbols) in response to different UV fluences: 54 J/m² (A), 162 J/m² (B) and 324 J/m² (C).** Data represent average values and standard deviations ($n \geq 6$). The horizontal line on the bottom of each chart represents statistically significant differences between the two tested strains ($p \leq 0,05$).

Ko dodamo izoliran prodigiozin nepigmentirani mutanti, celice postanejo pigmentirane, najverjetneje zaradi prevzema pigmenta v celične membrane (Purkayatsha in Williams, 1960). Z dodatkom prodigiozina lahko izboljšamo Maltuzijski fitnes nepigmentirane mutante (Slika 24). Ta efekt je odvisen od koncentracije prevzetega pigmenta. Ko je koncentracija prevzetega prodigiozina v mutanti enaka koncentraciji pigmenta v divjem tipu (18,4 mg/L), se njuna fitnesa izenačita.

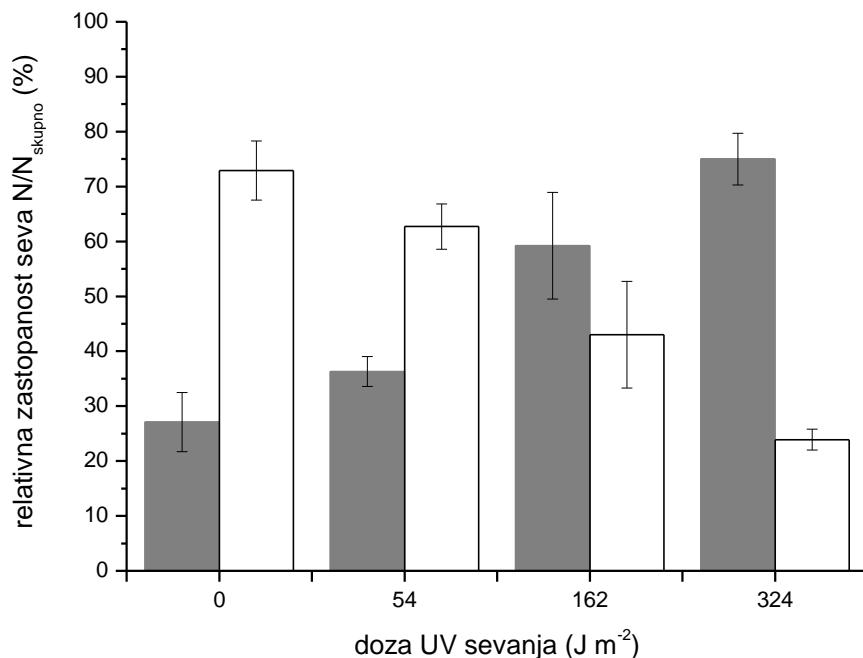


Slika 24: **Maltuzijski fitnes nepigmentirane mutante *V. ruber* po dodatku izoliranega prodigiozina iz divjega tipa po prejeti dozi sevanja 324 J/m^2 .** WT – divji tip, BM- nepigmentirana mutanta, BM + X mg/L prevzetega pigmenta. Rezultati so prikazani kot povprečja in standarni odkloni ($n \geq 3$).

Figure 24: **Malthusian fitness of the non-pigmented *Vibrio* sp. upon addition of the pigment extract.** The non-pigmented mutant was grown for 8 hours and irradiated with 324 J/m^2 . WT - wild type, BM- non-pigmented mutant, BM + X mg/L of incorporated pigment. Data represent average values and standard deviations ($n \geq 3$).

Da bi preučili odnos med obema sevoma v UV stresu, smo ju gojili v kokulturah. Začetno razmerje med številom celic divjega tipa in nepigmentirane mutante je bilo 2:3. Nepigmentirana mutanta je prerasla divji tip, ko ni bilo UV stresa (Slika 25). Ker bi lahko bila to posledica začetne prednosti v številu celic, smo eksperiment ponovili tako, da je

bilo razmerje v številu celic 5,5 : 4,5 v korist divjega tipa. Po 8 urah rasti je bilo razmerje 3,9 : 6,1, kar ponovno prikazuje dominantnost nepigmentirane mutante.



Slika 25: Relativna zastopanost sevov *V. ruber* WT (sivi stolpci) in *V. ruber* BM (beli stolci) gojenih v kokulturi in izpostavljenih različnim dozam UV sevanja. Podatki so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n = 3$).

Figure 25: Relative abundances of *Vibrio* WT and BM strains at the end of incubation with and without UV radiation. The initial ratio of the wild type *V. ruber* (grey columns) and the non-pigmented mutant (white columns) was 2:3. Data represent average values and standard deviations ($n = 3$).

Z višanjem UV stresa se je razmerje v kokulturah spremenjalo. Preživetje nepigmentirane mutante se je nižalo z višanjem doze UV sevanja, medtem ko je divji tip postajal vse bolj dominanten (Slika 25). Na podlagi gojenja obeh sevov v monokulturah in kokulturah smo preračunali Maltuzijske fitnese (Preglednica 14).

Preglednica 14: **Primerjava Maltuzijskega fitnesa divjega tipa in nepigmentirane mutante bakterije *V. ruber* v monokulturah in kokulturah.** Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n \geq 3$).

Table 14: **Comparison of Malthusian fitnesses of the wild type strain and non-pigmented mutant of *V. ruber* grown in monoculture and co-culture.** Data represent average values and standard deviations ($n \geq 3$).

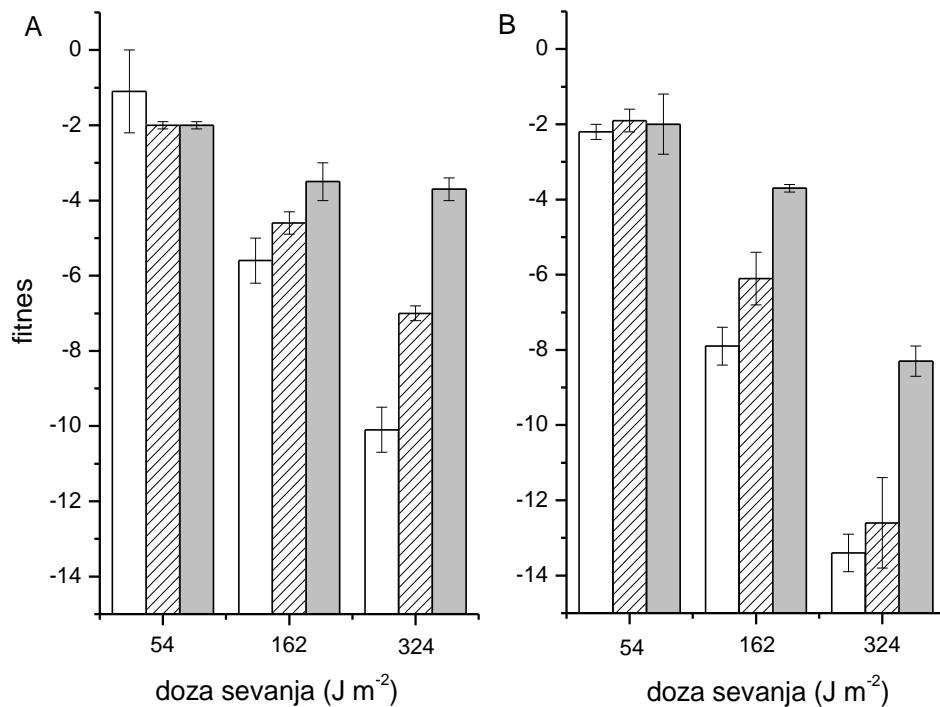
| Bakterijski sev | Doza UV sevanja (J/m^2) | | |
|----------------------------------|-----------------------------|----------------|-----------------|
| | 54 | 162 | 324 |
| <i>V. ruber</i> WT v monokulturi | $-1,1 \pm 1,1$ | $-5,6 \pm 0,6$ | $-10,1 \pm 0,6$ |
| <i>V. ruber</i> WT v kokulturi | $-2,1 \pm 0,7$ | $-7,0 \pm 1,1$ | $-9,2 \pm 0,2$ |
| <i>V. ruber</i> BM v monokulturi | $-2,2 \pm 0,2$ | $-7,9 \pm 0,5$ | $-13,4 \pm 0,5$ |
| <i>V. ruber</i> BM v kokulturi | $-2,6 \pm 0,7$ | $-8,3 \pm 0,7$ | $-11,4 \pm 0,0$ |

Pri nižjih dozah UV sevanja ni statistično signifikantnih razlik v Maltuzijskem fitnesu sevov v monokulturi ali v kokulturi. Z višanjem UV stresa pa se fitness nepigmentirane mutante bistveno zviša v kokulturah. Prav tako se rahlo zviša tudi fitness divjega tipa. Ker bi lahko prodigiozin ščitil pred UV tudi druge bakterije iz rodu *Vibrio*, smo testirali kokulturo *V. ruber* WT in *V. harveyi*. Zanimivo je, da je po 8 urah rasti začetno razmerje v številu celic 1,3:1 prešlo v razmerje 13:1. Divji tip bakterije *V. ruber* je prerastel bakterijo *V. harveyi*, saj je bil fitness slednje $0,8 \pm 0,8$, medtem ko je imela bakterija *V. ruber* fitnes $4,0 \pm 0,1$.

4.2.2.4.2 Odpornost proti UV sevanju se zviša v viskoznih medijih

Viskoznost se v naravi, kot tudi v laboratoriju zviša s prisotnostjo polimerov, najpogosteje s polisaharidi. V našem primeru smo uporabili hidroksietil celulozo, ki ima visoko absorpcijo v UV območju (Priloga E). Bakterijska seva *V. ruber* WT in BM smo gojili v monokulturi ali kokulturi v gojišču PKS s 3 % NaCl in viskoznostmi 0,8, 8,0 in 29,4 mPas. Določili smo fitnes celic po obsevanju s tremi različnimi dozami UV sevanja.

Rezultati kažejo da se z višanjem viskoznosti fitnes obej bakterij izboljšuje pri višjih dozah UV (162 in 324 J/m^2), medtem ko pri najnižji dozi ni signifikantnih razlik. Ta rezultat lahko pripisemo absorpciji HEC v UV območju med 250 in 300 nm (Priloga E). Kljub temu pa je zaščitni efekt samega prodigiozina še vedno očiten, saj je fitness divjega tipa signifikantno višji kot pri beli mutanti pri vseh viskoznostih in dozah. Statistično nesignifikantne razlike so le pri najnižji dozi sevanja.



Slika 26: Fitnes bakterije *V. ruber* (A) in njene nepigmentirane mutante (B) gojene v PKS 3 % NaCl mediju z viskoznostjo 0,8 mPas (beli stolpci), 8,1 mPas (beli šrafirani stolci) in 29,4 mPas (sivi stolci), ki so bile izpostavljene različnim dozam UV sevanja. Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n = 3$).

Figure 26: Fitness of *V. ruber* (A) and its non-pigmented mutant (B) grown in PYE medium with 3 % NaCl and viscosities of 0,8 (white columns); 8,0 (white hatched columns) and 29,4 mPas (grey columns) that were exposed to different doses of UV radiation. Results are shown as averages and standard deviations ($n = 3$).

Ker smo pokazali, da nepigmentirana mutanta lahko bolje preživi UV stres v prisotnosti divjega tipa (Preglednica 14), smo preverili kakšen je vpliv viskoznosti na ta pojav. Pri najvišji dozi UV sevanja nepigmentirana mutanta v kokulturi z divjim tipom preživi za vsaj 2 velikostna reda bolje (pri najvišji viskoznosti celo za 4 velikostne rede), medtem ko ima divji tip nižji fitnes, kot če je v kulturi sam (Preglednica 15). Ta odnos se zdi ali zajedavski ali altruističen, saj ima nepigmentirana mutanta korist na račun slabšega preživetja divjega tipa. Viskoznost je torej spremenil fitnes divjemu tipu, ki z višanjem viskoznosti slabše raste v kokulturah kot v čisti kulturi, kar je ravno obratno od nepigmentirane mutante.

Preglednica 15: **Fitnesi bakterije *V. ruber* (WT) in njene nepigmentirane mutante gojene v PKS 3 % NaCl mediju z različnimi viskoznostmi v monokulturi ali kokulturi, ki so bile izpostavljene dozi UV sevanja 342 J/m².** Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n = 3$). Zvezdica pomeni statistično signifikantno razliko med fitnesom v monokulturi in kokulturi ($\alpha = 0,05$).

Table 15: **Fitness of *V. ruber* and its non-pigmented mutant grown in PYE medium with 3 % NaCl with different viscosities in monoculture and co-cultures, that were exposed to 342 J m⁻² of UV radiation.** Results are shown as averages and standard deviations ($n = 3$). Asterisks denote statistically significant differences in fitness between monocultures and co-cultures ($\alpha = 0,05$).

| Viskoznost (mPas) | Fitnes bakterijskih celic | | | |
|----------------------|---------------------------|--------------|--------------------|---------------|
| | <i>V. ruber</i> WT | | <i>V. ruber</i> BM | |
| | monokultura | kokultura | monokultura | kokultura |
| 0,8 | -10,1 ± 0,6 | -9,2 ± 0,2 | -13,4 ± 0,5 | -11,4 ± 0,0 * |
| 8,0 | -7,0 ± 0,2 | -8,7 ± 0,3 * | -12,6 ± 1,2 | -10,5 ± 0,1 * |
| 29,4 | -3,7 ± 0,3 | -5,1 ± 0,2 * | -8,3 ± 0,4 | -5,9 ± 0,7 * |

4.3 FIZIOLOGIJA IZBRANIH BAKTERIJ V RAZLIČNO VISKOZNIH MEDIJIH

Vpliv viskoznosti na nekatere izbrane bakterijske seve smo preverjali v gojišču M9 z različnimi koncentracijami HEC. Izbrani so bili trije splošni modelni organizmi *E. coli*, *B. subtilis* in *V. harveyi*. Predvidevali smo, da bo na njihovo fiziologijo viskoznost medija signifikantno vplivala. Gojili smo jih pri optimalnih pogojih za njihovo rast, spremenjali pa viskoznost. Ob tem so nekateri drugi pomembni faktorji za rast, kot so pH, vodna aktivnost in koncentracija raztopljenega kisika s spremembo koncentracije HEC ostali primerljivi (Priloga F).

4.3.1 Viskoznost gojišč in bakterijskih kultur

Viskoznost je pričakovano eksponentno naraščala z višanjem koncentracije HEC v gojišču (Preglednica 16, Priloga F). Izbrani bakterijski sevi med rastjo ne vplivajo na viskoznost rastnega medija, saj je viskoznost kultur po 24 urah inkubacije ostala primerljiva z začetno

viskoznostjo gojišča (Preglednica 16, Prilogi F in H). Testirani bakterijski sevi niso bili sposobni encimske razgradnje molekul HEC, saj se koncentracija redukcijskih koncev med inkubacijo ni spremnjala (Priloga G).

Preglednica 16: **Viskoznost sterilnih gojišč in bakterijskih kultur *E. coli*, *B. subtilis* in *V. harveyi*, ki so rasle 24 ur v minimalnem mediju M9 z različnimi koncentracijami HEC.** Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n \geq 3$).

Table 16: **Viscosity of sterile growth media and bacterial cultures of *E. coli*, *B. subtilis* and *V. harveyi* that were grown for 24 h in minimal M9 medium with different concentrations of HEC.** Data are shown as averages and standard deviations ($n \geq 3$).

| Koncentracija HEC (%) | Viskoznost (mPas) | | | |
|--------------------------|-------------------|----------------|--------------------|-------------------|
| | Gojišče | <i>E. coli</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>V. harveyi</i> |
| 0 | $0,9 \pm 0,01$ | $0,9 \pm 0,02$ | $0,9 \pm 0,1$ | $0,9 \pm 0,3$ |
| 0,2 | $2,4 \pm 0,2$ | $2,4 \pm 0,2$ | $1,7 \pm 0,2$ | $2,4 \pm 0,4$ |
| 0,4 | $5,0 \pm 0,5$ | $5,0 \pm 0,4$ | $5,5 \pm 1,5$ | $5,0 \pm 0,1$ |
| 0,5 | $7,5 \pm 0,6$ | $7,4 \pm 0,6$ | $8,7 \pm 0,1$ | $8,3 \pm 0,9$ |
| 0,75 | $16,0 \pm 0,7$ | $16,1 \pm 0,7$ | $17,0 \pm 0,6$ | $17,3 \pm 0,2$ |
| 1 | $26,5 \pm 1,1$ | $26,2 \pm 0,8$ | $30,0 \pm 4,3$ | $31,9 \pm 6,6$ |

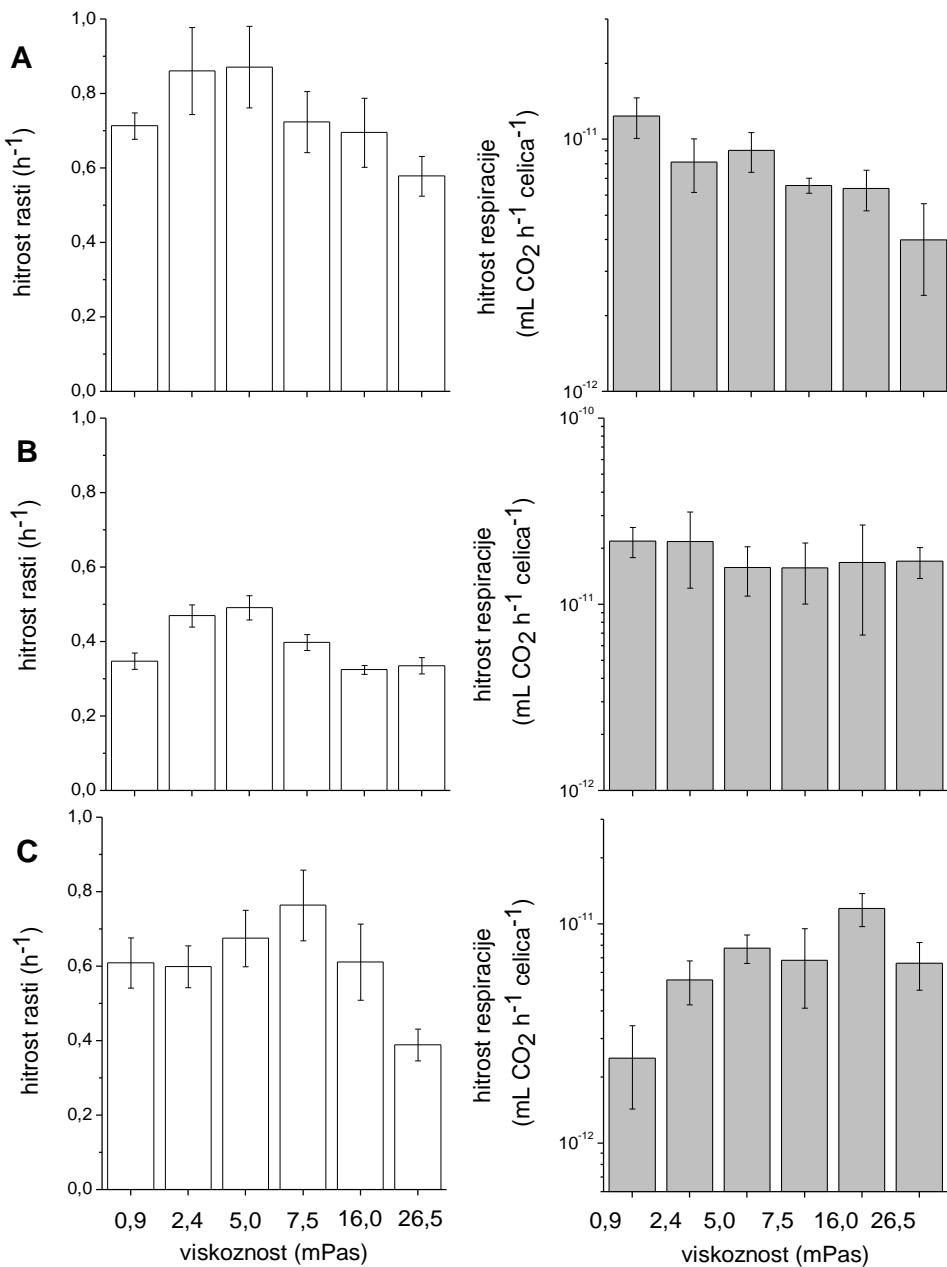
4.3.2 Rast in metabolna aktivnost

Preverili smo kakšen je odziv izbranih bakterijskih sevov na povišano viskoznost v gojišču M9 pri pogojih, ki so za te seve običajno optimalni (temperatura, slanost in koncentracija glukoze). Hitrost rasti bakterije *E. coli* z višanjem viskoznosti ostaja enaka (p-vrednosti med 0,076 in 0,1721), pri najvišji viskoznosti pa pada (p-vrednosti glede na ostale testirane viskoznosti med 0,014 in 0,021). Metabolna aktivnost celic je najnižja pri najvišji testirani viskoznosti (Slika 27A).

Bakterija *B. subtilis* se drugače odzove na povišano viskoznost rastnega medija (Slika 27B). Razlik v hitrosti produkcije CO₂ nismo zaznali (p-vrednosti med 0,179 in 0,997). Medtem ko je bila metabolna aktivnost konstantna pri vseh testiranih viskoznostih, pa hitrost rasti najprej narasla, nato pa se je spustila nazaj na nivo rasti pri najnižji

viskoznosti. Statistično značilno povišanje hitrost rasti smo opazili pri viskoznostih medija med 2,4 in 7,5 mPas (p-vrednosti glede na ostale viskoznosti medija so med 0,001 in 0,047). Rezultati kažejo, da celice delujejo najbolj optimalno v območju viskoznosti med 2,4 in 7,5 mPas, saj sta bili hitrost rasti in metabolna aktivnost celic v obeh ekstremnih viskoznostih primerljivi.

Podoben odziv na povišano viskoznost medija kot smo ga opazili pri bakteriji *V. ruber*, smo opazili pri bližnjem sorodnik *V. harveyi* (Slika 27C). Hitrost rasti je bila podobna pri viskoznostih do 16,0 mPas, potem pa je statistično značilno padla (p-vrednosti glede na ostale viskoznosti med 0,003 in 0,026). Ob tem je metabolna aktivnost pri vseh viskoznostih višjih od 0,9 mPas signifikantno povišana (p-vrednosti glede na najnižjo viskoznost med 0,002 in 0,029). Pri obeh proučevanih bakterijah iz rodu *Vibrio*, se visoka viskoznost (nad 20 mPas) zdi stresna situacija.

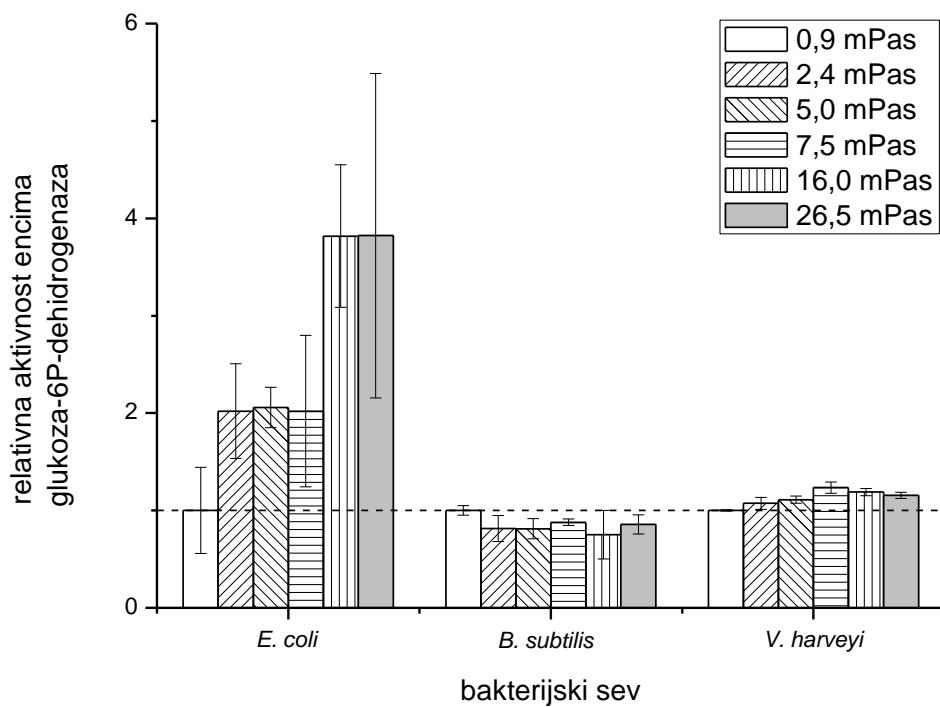


Slika 27: Hitrost rasti in hitrost respiracije izbranih bakterijskih sevov gojenih v minimalnem M9 gojišču z različnimi viskoznostmi. A – *E. coli*, B – *B. subtilis*, C – *V. harveyi*. Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n = 3$).

Figure 27: Growth rate and respiration rate of selected bacterial strains grown in minimal M9 medium at different viscosities. A - *E. coli*, B – *B. subtilis*, C - *V. harveyi*. Results are shown as averages and standard deviations ($n = 3$).

4.3.3 Pretok ogljika skozi centralne metabolne poti

Pretok ogljika skozi centralne metabolne poti bakterij smo spremljali preko aktivnosti encimov fosfofruktokinaza, glukoza-6-fosfat dehidrogenaza in piruvat kinaza (Priloga I). Pri vseh bakterijskih sevih je bila najmanj aktivna fosfofruktokinaza, najbolj pa glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (Priloga I). Med posameznimi viskoznostmi ni bilo bistvenih razlik v aktivnosti fosfofruktokinaze in piruvat kinaze, med tem ko se je aktivnost GPD tako kot pri bakteriji *V. ruber* zvišala tudi pri bakteriji *E. coli* in *V. harveyi* (p-vrednosti 0,047 in 0,001). Povišane aktivnosti GPD nismo opazili le pri bakteriji *B. subtilis*. Rezultati kažejo, da celice večino ogljika kanalizirajo skozi ED pot glikolize ali pot pentoze fosfata, z višanjem viskoznosti pa to postane še bolj izrazito. Edina bakterija, ki je v bolj viskoznih medijih imela povišano aktivnost PK in FFK, je bila *V. harveyi* (Priloga I3).



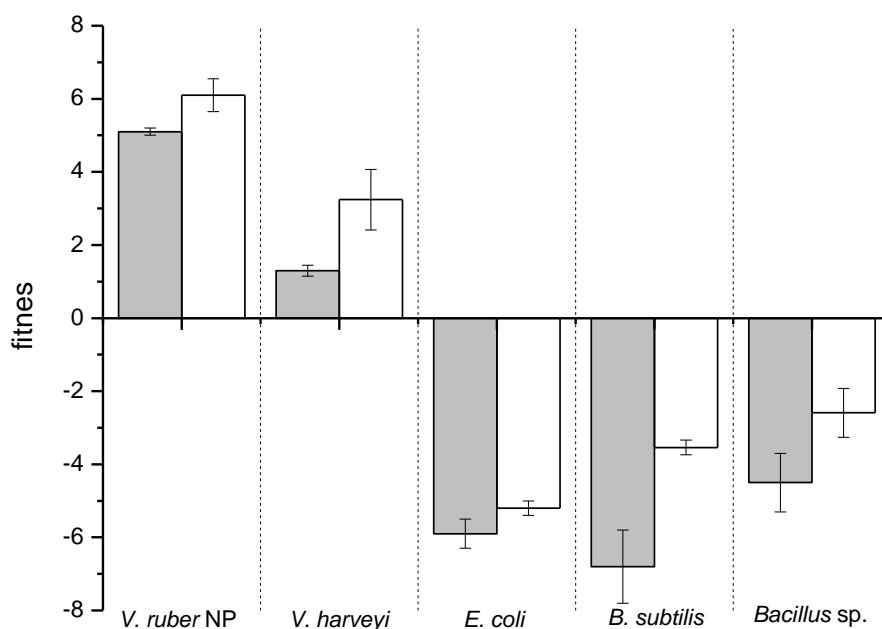
Slika 28: Aktivnost encima glukoza-6-fosfat dehidrogenaza v celičnih ekstraktih bakterij *E. coli*, *B. subtilis* in *V. harveyi* gojenih v M9 gojišču z različnimi viskoznostmi. Vrednosti so prikazane relativno glede na aktivnost encima pri najnižji viskozni. Črtkana linija predstavlja aktivnost pri najnižji viskozni. Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odklon ($n = 3$).

Figure 28: Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity of *E. coli*, *B. subtilis* and *V. harveyi* at different HEC concentrations normalized to the lowest HEC concentration (0 %). The dashed line represents activity at the lowest HEC concentration. Data are shown as averages and standard deviations ($n = 3$).

4.4 VPLIV VISKOZNOSTI NA ODNOSE MED BAKTERIJAMI

Medvrstne interakcije med bakterijami so različne, pogosto pa jih narekujejo protibakterijske spojine, ki jih sintetizirajo nekateri sevi. Naša hipoteza je bila, da je odnos med izbranim sevom in pigmentirano bakterijo *V. ruber* WT odvisen od občutljivosti izbranega seva na prodigiozin.

Zastopanost sevov v kokulturi je odvisna od občutljivosti sevov na prodigiozin (Slika 29), le-ta pa se zdi povezana s sorodnostjo izbranih sevov. Bakterije iz rodu *Vibrio* v kokulturah sobivajo, pri čemer ima bakterija *V. ruber* BM boljši fitnes kot bakterija *V. harveyi*. V ostalih kokulturah je odnos antagonističen, saj prisotnost divjega tipa ali mutante bakterije *V. ruber*, povzroči negativen fitnes bakterij *E. coli*, *B. subtilis* in *Bacillus* sp. Glede na to, da je fitnes teh sevov v kokulturi z divjim tipom bakterije *V. ruber* statistično signifikantno nižji (p-vrednosti 0,050, 0,006 in 0,039) kot v kokulturah z *V. ruber* BM, lahko razliko pripisemo protibakterijski aktivnosti prodigiozina. Koncentracija prodigiozina v kokulturah ni bila enaka (Priloga J), kar kaže, da so sevi različno občutljivi na pigment.



Slika 29: Fitnesi izbranih bakterijskih sevov gojenih 20 ur v kokulturi z bakterijo *V. ruber* WT (sivi stolpci) ali *V. ruber* BM (beli stolpci). Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n = 3$).

Figure 29: Fitness of selected bacterial strains grown in co-cultures for 20 h with *V. ruber* WT or *V. ruber* BM (white columns). Results are shown as averages and standard deviations ($n = 3$).

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) se uporablja pri določanju občutljivosti bakterij na antibiotike. Ker lahko prodigiozin smatramo kot protibakterijski agens smo za izbrane seve določili MIK, MIK_{50} in MBK vrednosti (Preglednica 17) ter jih primerjali s koncentracijo pigmenta, ki jo je bakterija *V. ruber* WT proizvedla v kokulturah s temi sevi. Koncentracija prodigiozina v kokulturi bakterij *V. ruber* WT in *V. ruber* BM je bila bistveno nižja od MIK vrednosti za nepigmentirano mutanto, kar pojasnjuje dobro rast in visok fitnes (Slika 29). Pri bakteriji *V. harveyi* je bilo v kokulturah približno enako pigmenta kot je potrebnega za inhibicijo tega seva, vendar pa je vseeno imel rahlo pozitiven fitnes. Predvidevamo, da niso vse celice dobine zadostne doze za inhibicijo, in so se lahko dalje razmnoževale. Oba seva iz rodu *Bacillus* sta imela MIK vrednost signifikantno nižjo kot je bila izmerjena koncentracija prodigiozina v kokulturah, kar je skladno z negativnim fitnesom. V kokulturi z bakterijo *E. coli* je bakterija *V. ruber* WT proizvedla malo manj pigmenta kot je MIK vrednost, torej bi morala bakterija *E. coli* imeti pozitiven fitnes. Odsotnost le-tega kaže, da so verjetno udeleženi še dodatni protibakterijski mehanizmi.

Preglednica 17: **MIK, MIK_{50} in MBK vrednosti za prodigiozin za izbrane bakterijske seve.** Rezultati so podani kot povprečja in standardni odkloni ($n = 3$).

Table 17: **MIC, MIC_{50} and MBC values of prodigiosin for selected bacterial strains.** Results are shown as averages and standard deviations ($n = 3$).

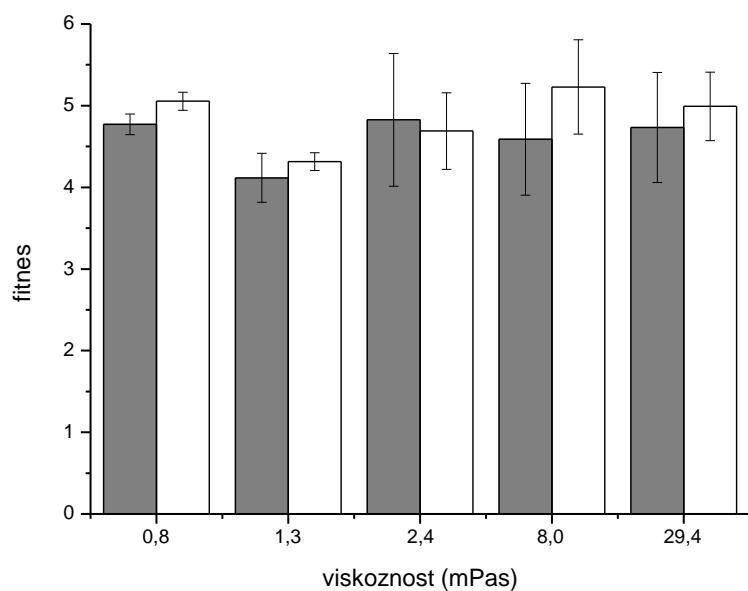
| Bakterijski sev | MIK ($\mu\text{g/mL}$) | MIK_{50} ($\mu\text{g/mL}$) | MBK ($\mu\text{g/mL}$) |
|---------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| <i>V. ruber</i> BM | $\geq 236,4 \pm 14,3$ | $141,2 \pm 7,5$ | $\geq 236,4 \pm 14,3$ |
| <i>V. harveyi</i> | $29,6 \pm 1,8$ | $0,5 \pm 0,05$ | $236,4 \pm 14,3$ |
| <i>E. coli</i> | $73,9 \pm 4,5$ | $2,8 \pm 0,2$ | $\geq 236,4 \pm 14,3$ |
| <i>B. subtilis</i> | $1,9 \pm 0,1$ | $0,1 \pm 0,005$ | $1,9 \pm 0,1$ |
| <i>Bacillus</i> sp. | $3,7 \pm 0,2$ | $0,1 \pm 0,005$ | $3,7 \pm 0,2$ |

Ker viskoznost lahko vpliva na potek interakcij med različnimi bakterijskimi sevi gojenimi v kokulturah, zato smo na podlagi literature in predhodno pridobljenih rezultatov (Preglednica 15) predvidevali, da bo:

- viskoznost spremenila odnose med bakterijo *V. ruber* in bakterijami, s katerimi sobiva, ter
- da se z naraščajočo viskoznostjo protibakterijsko delovanje pigmenta zmanjšuje.

4.4.1 Vpliv viskoznosti na kokulturo bakterij *V. ruber* WT in *V. ruber* BM

Bakterija *V. ruber* BM je sposobna prerasti bakterijo *V. ruber* WT v neposredni kompeticiji za hranila, kar je še posebej izrazito po 20 urah rasti v kokulturah (Slika 29). Razlog za to je najverjetneje pigmentacija divjega tipa, za katero potrebuje energetski vložek, nepigmentirana mutanta pa tega stroška nima. Glede na vrednosti MIK in MBK (Preglednica 17) sobivanje obeh sevov ni nepričakovano, saj imata oba seva kažeta imunost na prodigiozin kot antibakterijski agens. Ob povišani viskoznosti medija pa statistično značilnih razlik v fitnessih obeh sevov ni, kar pomeni, da lahko oba seva enako učinkovito dostopata do hranil, kot tudi, da se strošek pigmentacije pri višjih viskoznostih ne pozna več. Divji tip je proizvedel približno 1,5 do 2,2-krat manj pigmenta kot pri najnižji viskozni gojišča (17,8 mg/L) (Priloga J).

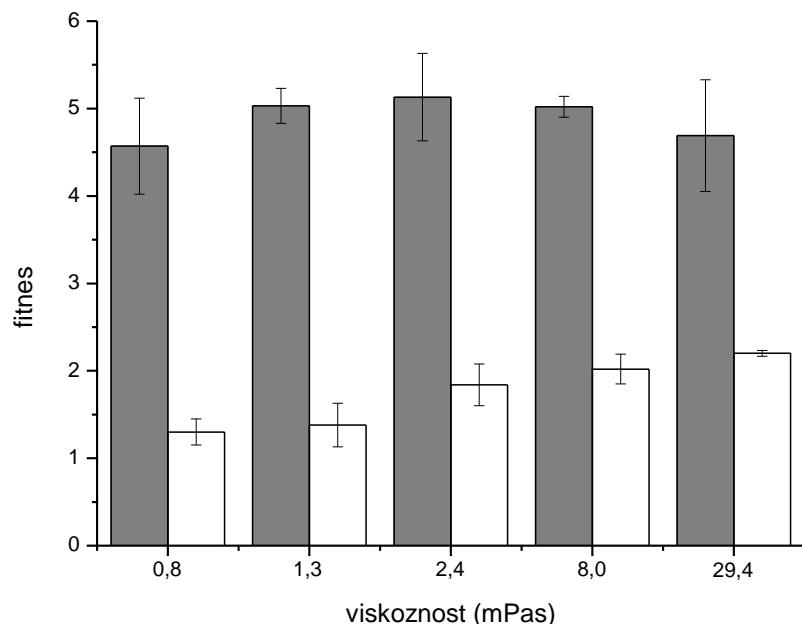


Slika 30: Fitnes bakterije *V. ruber* WT (sivi stolpci) in njene nepigmentirane mutante (beli stolpci) po 20 urah rasti v kokulturi z začetnim razmerjem nacepljanja 2:1 (V:V) v korist divjega tipa. Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n = 3$).

Figure 30: Fitness of *V. ruber* WT (grey columns) and its non-pigmented mutant (white columns) after 20 h of growth in co-cultures with initial inoculum ratio 2:1 (V:V) in the favour of the wild type. Results are shown as averages and standard deviations ($n = 3$).

4.4.2 Vpliv viskoznosti na kokulturo bakterij *V. ruber* WT in *V. harveyi*

Bakterija *V. harveyi* je občutljiva na prodigiozin kot protibakterijsko učinkovino, vendar pa je bila koncentracija pigmenta potrebna za inhibicijo celotne populacije (Preglednica 17) višja od koncentracije prodigiozina v kokulturah z divjim tipom bakterije *V. ruber*. Z višanjem viskoznosti se fitnes bakterije *V. harveyi* izboljšuje od 1,3 pri najnižji viskoznosti do 2,2 pri najvišji (p-vrednosti med 0,029 in 0,0005), kar pomeni, da preživi približno 10-krat več celic. Fitnes bakterije *V. ruber* WT je ostal približno enak in je v rangu med 4,6 in 5 (p-vrednosti med 0,24 in 0,82).

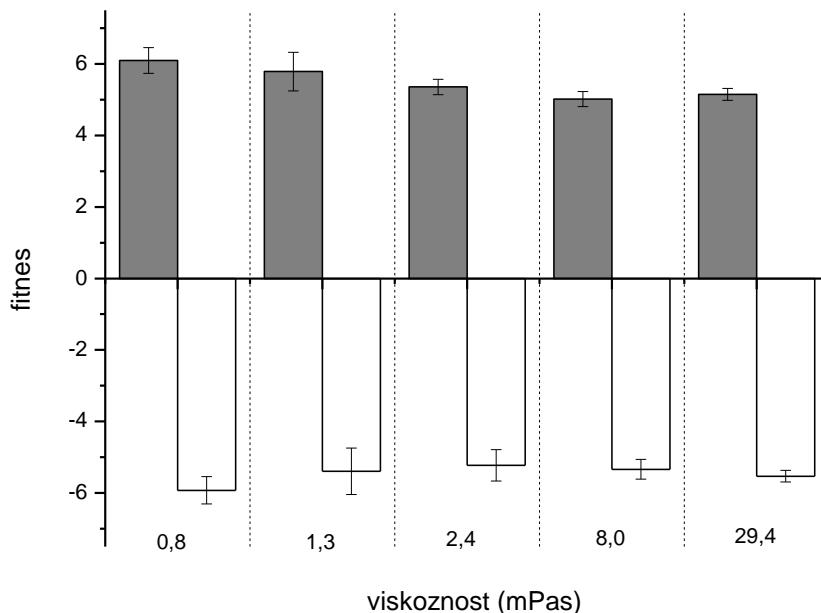


Slika 31: Fitnes bakterije *V. ruber* WT (sivi stolpci) in bakterije *V. harveyi* (beli stolpci) po 20 urah rasti v kokulturi z začetnim razmerjem nacepljanja 2:1 (V:V) v korist bakterije *V. harveyi*. Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni (n = 3).

Figure 31: Fitness of *V. ruber* WT (grey columns) and *V. harveyi* (white columns) after 20 h of growth in co-cultures with initial inoculum ratio 2:1 (V:V) in the favour of *V. harveyi*. Results are shown as averages and standard deviations (n = 3).

4.4.3 Vpliv viskoznosti na kokulturo bakterij *V. ruber* WT in *E. coli*

Koncentracija prodigiozina v kokulturah z bakterijo *V. ruber* je pri vseh viskoznostih nižja od vrednosti MIK, kar pomeni, da za popolno inhibicijo rasti bakterije *E. coli* ni dovolj pigmenta. Izrazito negativni fitnes bakterije *E. coli* se ni spremenil signifikantno z višanjem viskoznosti medija (p-vrednosti med 0,09 in 0,29) in je bil v rangu med -5,2 in -6 (Slika 32). To se je zgodilo kljub temu, da je bila koncentracija prodigiozina bistveno manjša pri višjih viskoznostih – za 2,2 do 3,8-krat (Priloga J). Način, s katerim prodigiozin ustavi rast in razmnoževanje bakterije *E. coli* v čistih kulturah, smo določali z eksperimenti, ki so opisani v poglavju 4.5.

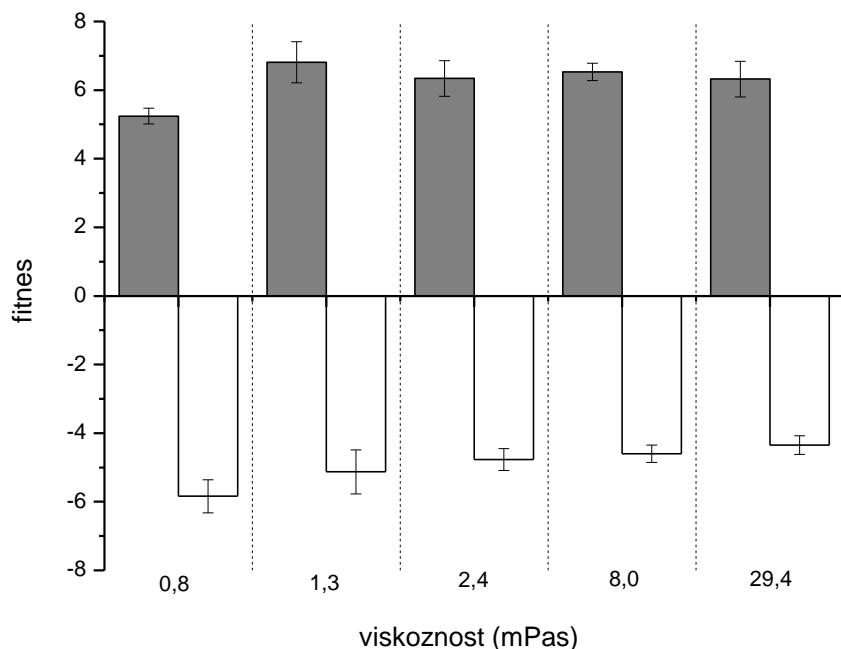


Slika 32: Fitnes bakterije *V. ruber* WT (sivi stolpci) in bakterije *E. coli* (beli stolpci) po 20 urah rasti v kokulturi z začetnim razmerjem nacepljanja 2:1 (V:V) v korist bakterije *E. coli*. Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni (n = 3).

Figure 32: Fitness of *V. ruber* WT (grey columns) and *E. coli* (white columns) after 20 h of growth in co-cultures with initial inoculum ratio 2:1 (V:V) in the favour of *E. coli*. Results are shown as averages and standard deviations (n = 3).

4.4.4 Vpliv viskoznosti na kokulturo bakterij *V. ruber* WT in *B. subtilis*

Bakterija *B. subtilis* je v kokulturi z bakterijo *V. ruber* imela izrazito negativen fitnes, ki se je zvišal pri višjih viskoznostih za približno rang in pol iz -5,84 na -4,35 (p-vrednost 0,0097), kar pomeni, da je preživelih celic med 10 in 100-krat več pri najvišji viskozniosti (Slika 33). Podobno kot pri kokulturah bakterij *V. ruber* in *E. coli* viskozna ne vpliva na tip odnosa, ki ostaja antagonističen. Čeprav imata oba seva v čistih kulturah enak fitnes, pa je v kokulturah bakterija *V. ruber* WT je dominantna (fitnes nad 5), najverjetneje na račun protimikrobnih aktivnosti prodigizina (Preglednica 17).

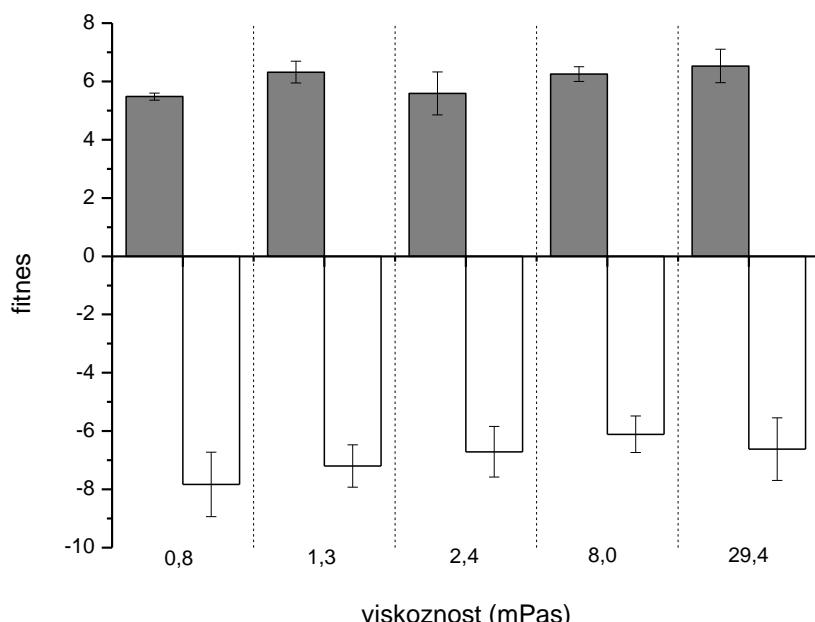


Slika 33: Fitnes bakterije *V. ruber* WT (sivi stolpci) in bakterije *B. subtilis* (beli stolpci) po 20 urah rasti v kokulturi z začetnim razmerjem nacepljanja 3:1 (V:V) v korist bakterije *B. subtilis*. Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n = 3$).

Figure 33: Fitness of *V. ruber* WT (grey columns) and *B. subtilis* (white columns) after 20 h of growth in co-cultures with initial inoculum ratio 3:1 (V:V) in the favour of *B. subtilis*. Results are shown as averages and standard deviations ($n = 3$).

4.4.5 Vpliv viskoznosti na kokulturo bakterij *V. ruber* WT in *Bacillus* sp.

Bakterija *V. ruber* ima v kokulturah z bakterijskim sevom, ki spada v rod *Bacillus* in je bil izoliran iz istega okolja ob istem času (Stopar in sod., 2004; Starič in sod., 2010), bistveno prednost kot je razvidno iz Slike 34. Viskoznost podobno kot v drugih kokulturah ni imela vpliva na fitnes bakterije *V. ruber* WT. Bakterija *Bacillus* sp. ima po drugi strani negativen fitnes, za katerega se zdi, da se z višanjem viskoznosti izboljšuje, vendar pa so napake dokaj velike in rezultati niso signifikantno različni (p-vrednosti med 0,08 in 0,66).



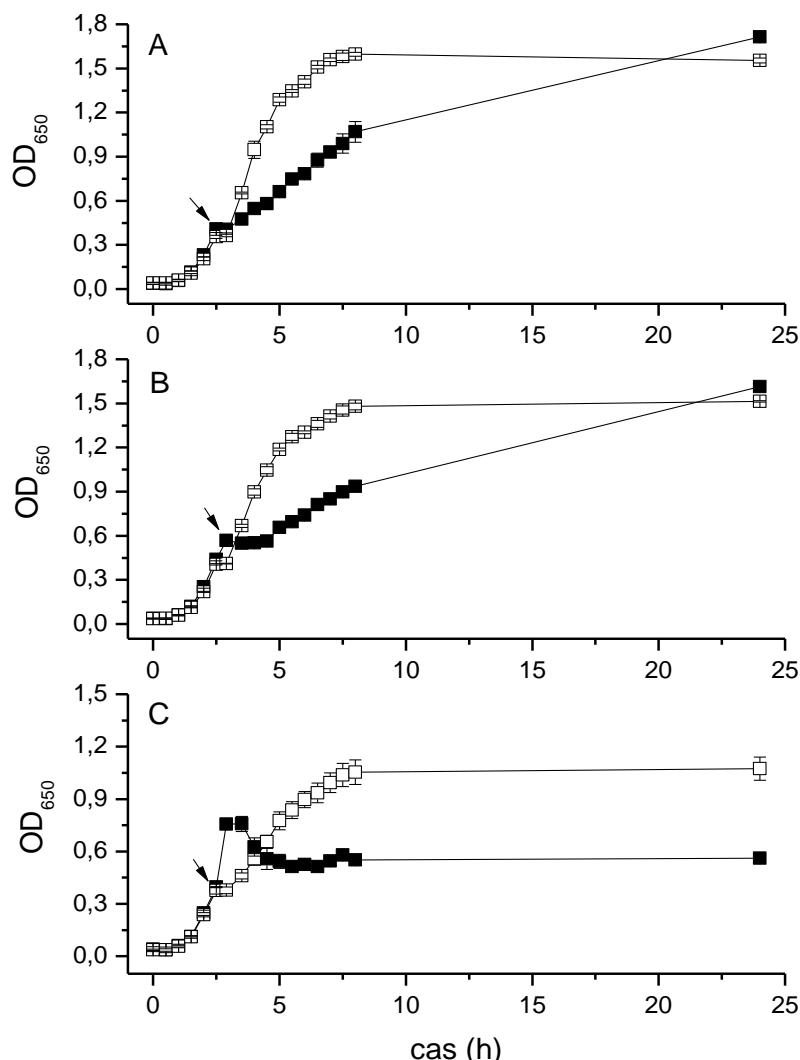
Slika 34: Fitnes bakterije *V. ruber* WT (sivi stolpci) in bakterije *Bacillus* sp. (beli stolci) po 20 urah rasti v kokulturi z začetnim razmerjem nacepljanja 3:1 (V:V) v korist bakterije *Bacillus* sp. Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni (n = 3).

Figure 34: Fitness of *V. ruber* WT (grey columns) and *Bacillus* sp. (white columns) after 20 h of growth in co-cultures with initial inoculum ratio 3:1 (V:V) in the favour of *Bacillus* sp. Results are shown as averages and standard deviations (n = 3).

4.5 MEHANIZEM PROTIBAKTERIJSKEGA DELOVANJA PRODIGIOZINA NA BAKTERIJO *ESCHERICHIA COLI*

Določanje mehanizma protibakterijske aktivnosti na bakterijo *E. coli* smo izvajali v gojišču LB pri 37 °C, saj so to optimalni pogoji za rast te bakterije, ki ne predstavljajo dodatnega stresa za celice. Bakterijo *E. coli* smo tretirali s prodigiozinom, ki ga proizvaja bakterija *V. ruber*, in določili MIK, MBK in MIK₅₀. Minimalna inhibitorna koncentracija pri teh pogojih je približno 103,4 µg/mL, med tem ko 50 odstotno zaustavitev rasti dosežemo že z koncentracijo 7,5 µg/mL. Minimalna baktericidna koncentracija je višja od 240 mg/L, vendar pa se pri tej koncentraciji kaže tudi že vpliv topila (primerno redčen 96 % etanol) na rast bakterije *E. coli*. Za nadaljnje eksperimente smo bakterijo *E. coli* tretirali z 10, 60 in 120 µg/mL prodigiozina, kar predstavlja približne vrednosti MIK₅₀, MIK in vmesno koncentracijo, ki je približno enaka koncentraciji pigmenta v kokulturah (Slika 35).

V kolikor je bil prodigiozin dodan ob inokulaciji bakterije *E. coli* v sveže gojišče, rasti nismo opazili. Zato smo celice v nadalnjih eksperimentih tretirali v sredini eksponentne faze raste. Ko je bila koncentracija prodigiozina pod vrednostjo MIK (10 in 60 µg/mL) se je hitrost rasti znižala, vendar pa sama rast ni bila ustavljena (Slika 35A, Slika 35B). V primeru tretmaja s 60 µg/mL prodigiozina se je rast bakterije *E. coli* ustavila za dve uri (Slika 35B). Pri tretmaju s koncentracijo prodigiozina nad MIK vrednostjo (120 µg/mL) se je rast bakterije *E. coli* popolnoma ustavila (Slika 35C). Hkrati se število celic ni več spremenjalo in je ostalo enako kot v času tretmaja s pigmentom.

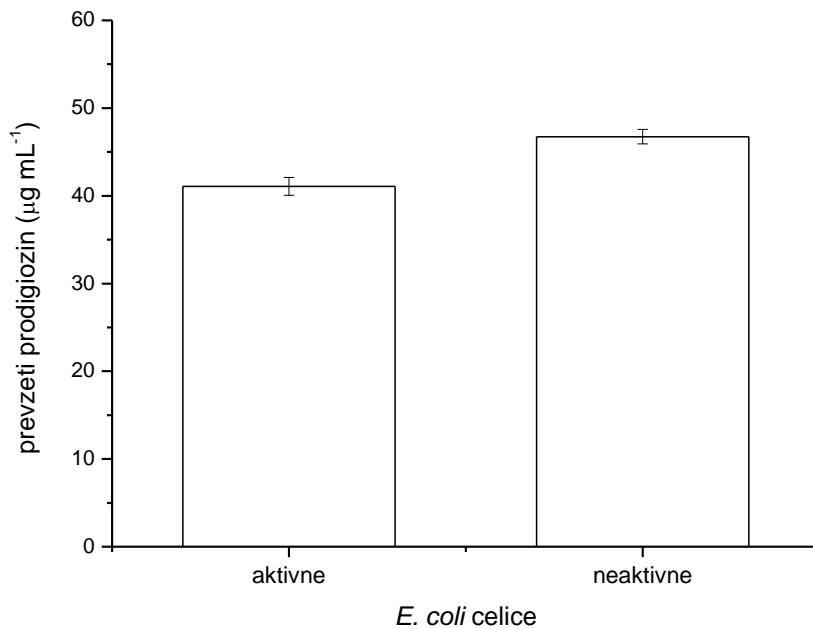


Slika 35: Rastne krivulje bakterije *E. coli* tretirane z etanolom (beli kvadratki) in 10 (A), 60 (B) in 120 µg/mL (C) prodigiozina (črni kvadratki). Puščice predstavljajo točko tretmaja. Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n = 3$).

Figure 35: Growth curves of *E. coli* treated with ethanol (open symbols) and 10 (A), 60 (B) and 120 µg/mL (C) prodigiosin (filled symbols). Arrows represent the point of treatment. Data are represented as averages and standard deviations ($n = 3$).

Zvišanje optične gostote takoj po dodatku pigmenta lahko pripišemo dodatku visoke koncentracije prodigiozina, ki pa so ga celice *E. coli* kasneje prevzele. Koncentracija prevzetega pigmenta je odvisna od koncentracije dodanega pigmenta. V prvih 5 urah po tretmaju so celice prevzele 22,5 µg/mL oziroma 41,1 µg/mL, ko je bilo dodanega 60

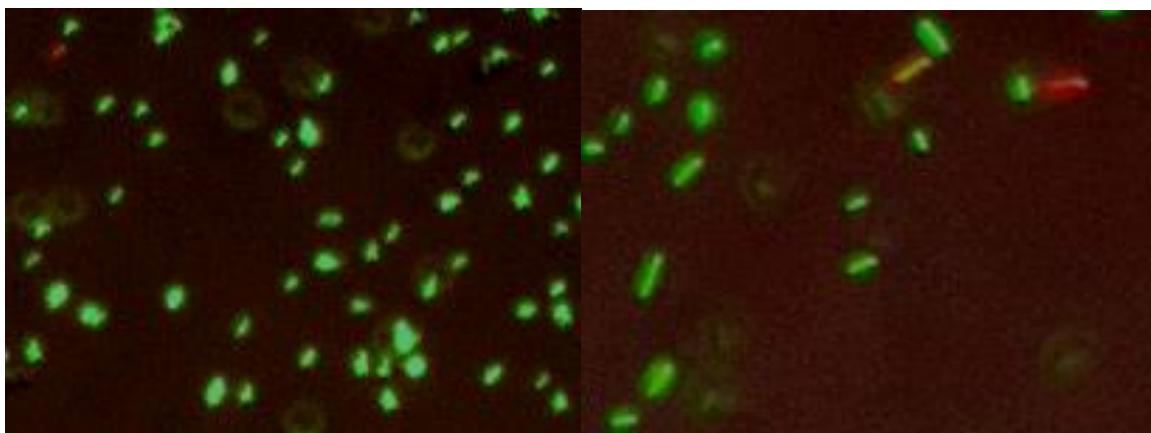
oziroma $120 \text{ } \mu\text{g/mL}$ prodigiozina. Proces prevzema ni aktiven, saj lahko neaktivne (avtoklavirane celice) prav tako prevzamejo pigment (Slika 36).



Slika 36: **Prevzem prodigiozina aktivnih (živih) in neaktivnih (avtoklaviranih) celic *E. coli* po 5 urah tretmaja z $120 \text{ } \mu\text{g/mL}$ prodigiozina.** Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n = 3$).

Figure 36: **Incorporated prodigiosin by viable and non-viable *E. coli* cells after 5 h of treatment with $120 \text{ } \mu\text{g/mL}$ of prodigiosin.** Data are represented as averages and standard deviations ($n = 3$).

Ker se prodigiozin najverjetneje vključi v membrane celic (Purkayatsha in Williams, 1960; Williams in Quadri, 1980; Williamson in sod., 2006), bi lahko vplival na intaktnost le-teh. S testom viabilnosti BacLight smo pokazali, da ima velika večina s prodigiozinom tretiranih celic intaktne membrane na podlagi katerih lahko sklepamo, da so celice viabilne (Slika 37).

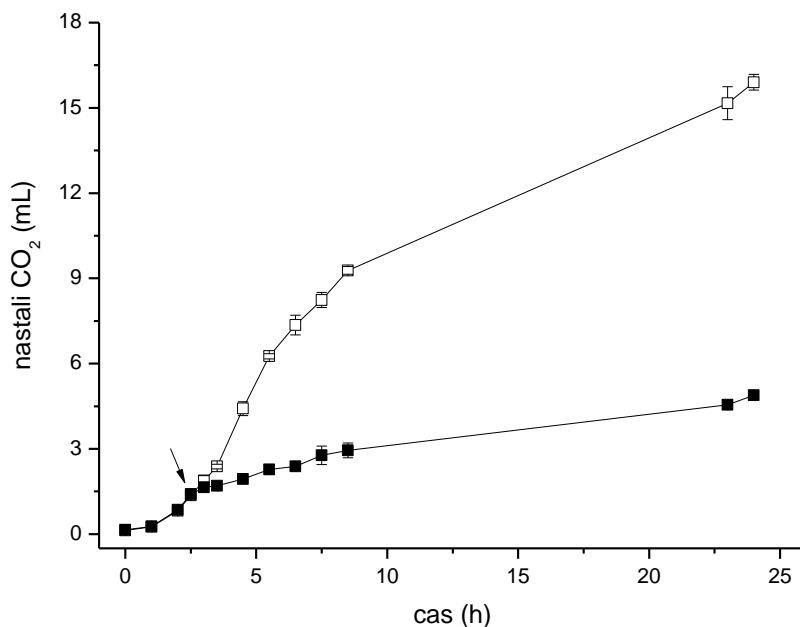


Slika 37: **Fotografije celic *E. coli* tretiranih z etanolom (levo) in prodigozinom (desno) pod invertnim fluorescenčnim mikroskopom s fluorescenčnimi filteri za zeleno fluorescentno barvilo SYTO 9 in rdeče fluorescentno barvilo propidijev iodid.** Zeleno obarvane celice so žive (intaktne membrane) in rdeče obarvane celice so nežive (poškodovane membrane).

Figure 37: **Photographs of *E. coli* cells treated with ethanol (left) and prodigiosin (right) under inverted fluorescence microscope with fluorescence filters for green fluorescent SYTO 9 and red fluorescent propidium iodide.** Green cells are viable (intact membranes) and red cells are dead (disintegrated membranes).

Tretma s prodigozinom je povročil, da je število celic manjše kot v kontroli, obenem pa so te celice daljše. Po 21,5 urah tretmaja, so z etanolom tretirane celice dolge $1,9 \pm 0,2 \mu\text{m}$, medtem ko so s prodigozinom tretirane celice dolge $3,6 \pm 0,4 \mu\text{m}$ long. V splošnem je podaljšanje celic značilno za indukcijo SOS odziva, ki je povezan s poškodbami DNK v bakterijskih celicah (Radman, 1974). Čeprav v evkariontskih celicah lahko poškoduje DNA (Ohkuma in sod, 1998; Seganish in Davis, 2005; Williamson in sod, 2006; Regourd in sod, 2007; Pandey in sod, 2009), pa prodigozin ni povzročil vidnih poškodb kromosomske DNA bakterije *E. coli*. Skladno s tem se tudi SOS odziv ni aktiviral, saj so celice s poročevalsko fuzijo gena *sulA* z genom za *gfp* (McCool in sod., 2004) ostale nefluorescentne.

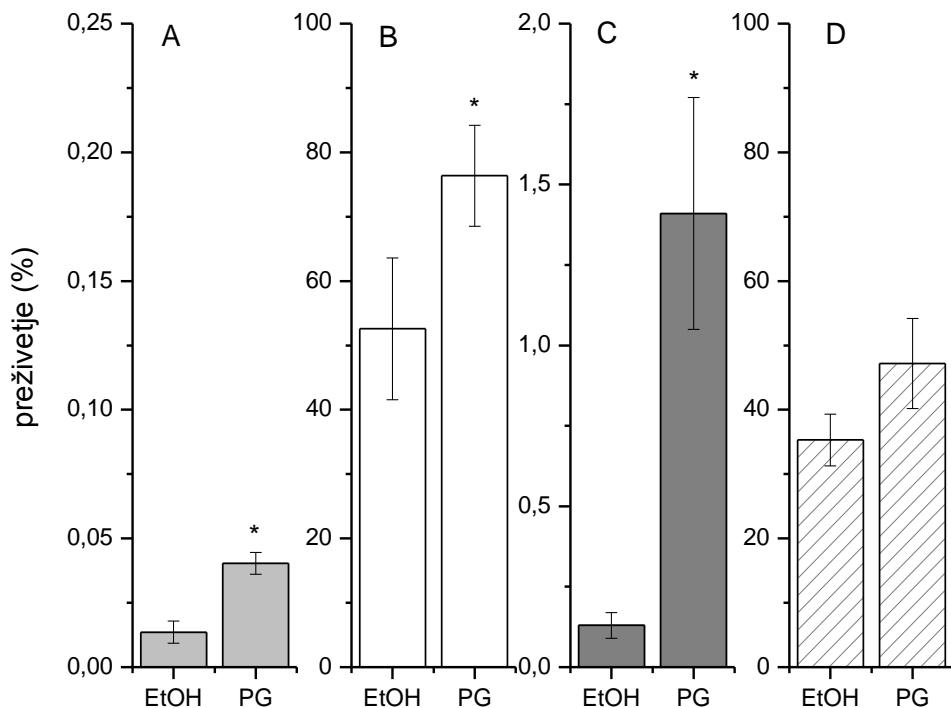
Celično dihanje preko določanja nastalega CO_2 je indikator celokupne metabolne aktivnosti bakterijskih celic. Kontrolne celice imajo tipičen profil produkcije CO_2 , ki je odvisen od rasti, medtem ko imajo s prodigozinom tretirane celice metabolno aktivnost znižano (Slika 38). Na koncu inkubacije je količina nastalega CO_2 približno 4-krat nižja kot v kontroli.



Slika 38: **Producija CO₂ celic *E. coli*, ki so bile tretirane z 120 mg/L prodigiozina (črni kvadratki) ali etanolom (svetlo sivi kvadratki).** Producija CO₂ netretiranih celic *E. coli* (kontrola) je predstavljena z belimi kvadratki. Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni (n = 4).

Figure 38: **Production of CO₂ by *E. coli* treated with 120 µg/mL of prodigiosin (filled symbols) and ethanol (open symbols).** Arrow represents the point of treatment. Data are represented as averages and standard deviations (n = 4).

Da bi nadalje določili mehanizem delovanja prodigiozina, smo preverili občutljivost bakterije *E. coli* na različne antibiotike. Občutljivost je lahko odvisna od metabolne aktivnosti celic in dostopnosti metabolnih intermedijatov (Allison in sod., 2011), nižja metabolna aktivnost pa bi lahko povzročila višjo odpornost proti antibiotikom. Bakterijo *E. coli* smo predtretirali s prodigiozinom ozziroma etanolom in izpostavili različnim antibiotikom – ampicilin, eritromicin, kanamicin in fleomicin.



Slika 39: Preživetje tretmaja z izbranimi antibiotiki bakterije *E. coli*, ki je bila predtretirana z etanolom (EtOH) oziroma 120 µg/mL prodigiozina (PG). Testirane koncentracije antibiotikov so bile 100 µg/mL ampicilin (A), 100 µg/mL eritromicin (B) 100 µg/mL kanamicin (C) in 5 µg/mL fleomicin (D). Os y se med posameznimi deli grafa razlikuje. Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n = 3$). Zvezdice predstavljajo statistično signifikantne razlike med predtretmajem z etanolom in prodigiozinom ($\alpha = 0,05$).

Figure 39: Antibiotic treatment survival of *E. coli* cells pretreated with ethanol (EtOH) or 120 µg/mL prodigiosin (PG). Tested antibiotic concentrations were 100 µg/mL ampicillin (A), 100 µg/mL erythromycin (B) 100 µg/mL kanamycin (C) and 5 µg/mL phleomycin (D). Note the difference in y-axis ranges. Data are shown as averages and standard deviations ($n = 3$). Asterisks represent statistically significant differences between ethanol and prodigiosin pretreatment ($\alpha = 0,05$).

Kot je razvidno iz Slike 39 predtretma s prodigiozinom vpliva na preživetje izpostavljenosti različnim antibiotikom. V primeru eritromicina preživi približno 80 % celic, ki so bile predtretirane s pigmentom, medtem ko je preživelilo le približno 40 % celic v kontroli (Slika 39B). Izboljšanje preživetja je statistično signifikantno (p -vrednost = 0,038). Podobno je bilo tudi pri tretmaju s kanamicinom, le da je bilo splošno preživetje slabše, pri čemer je le 1,5 % celic predtretiranih s prodigiozinom preživelilo tretma s

kanamicinom (Slika 39C). Kljub temu je to približno 10-krat boljše preživetje kot pri kontrolnih celicah (p -vrednost = 0,006). Majhen a signifikantnen (p -vrednost = 0,002) je imel prodigiozin na preživetje tretmaja z ampicilinom, ki je bil najbolj učinkovit med izbranimi antibiotiki. Preživel je manj kot 0,05% celic (Slika 39A). Edini antibiotik, na delovanje katerega prodigiozin ni imel vpliva (p -vrednost = 0,062) je bil fleomicin (Fig. 6D), kar je skladno z odsotnostjo poškodb DNK in indukcije SOS odziva.

Čeprav bi lahko prodigiozin deloval na bakterijske celice tudi tako, da povzroči lizo (Starič in sod., 2010), rezultati kažejo, da celice *E. coli* le inhibira. Glede na MBC vrednost za to bakterijo smo bili z uporabljenimi koncentracijami pod minimalno koncentracijo potrebno za baktericidno delovanje. Ko smo celice precepili v sveže gojišče brez prodigiozina, so lette lahko normalno rasle. Prodigiozin je deloval bakteriostatično na *E. coli*, vendar pa razvoja odpornosti nismo opazili. Ob vsakem tretmaju s pigmentom se je rast in razmnoževanje celic ustavila, ob precepitvi v sveže gojišče pa so celice ponovno delovale normalno (Priloga K). Fitnes celic tretiranih s pigmentom po 21,5 urah je ostal enak kot v prejšnjih ciklih tretmaja (Priloga K), kar kaže, da *E. coli* ni bila sposobna razviti odpornosti proti prodigiozinu.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Celuloza in njeni derivati so polimeri, ki se pogosto uporablja za zviševanje viskoznosti bakterijskih rastnih medijev. Hidroksietil celulozo (HEC), ki se v industriji uporablja kot gostilo, smo uporabili za manipulacijo viskoznosti rastnih medijev. Pomembno je, da jo izbrani proučevani bakterijski sevi encimsko ne razgradijo ter je posledično ne morejo uporabljati kot vir ogljika. Kot kažejo rezultati prisotnost HEC nima vpliva na koncentracijo raztopljenega kisika, pH ali vodno aktivnost (Preglednica 4, Priloga F). Vpliv viskoznosti na fiziologijo bakterij smo omejili na rang velikosti med 0,8 in 29,4 mPas (pri 1000 s^{-1}), kar predstavlja okolja s srednjo viskoznostjo. Destilirana voda ima pri $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ viskoznost 0,8 mPas, medtem ko lahko viskoznost morske vode variira med 0,8 in 1,8 mPas v odvisnosti od temperature (Fofonoff, 1962). Viskoznost biofilmov je po drugi strani bistveno višja, in je med 1 Pas vse do 10^8 Pas (Cheong in sod., 2009; Hall-Stoodley in sod., 2004). Srednje viskozne tekočine so na primer človeški mukus, slina ali solze, ki so približno 100-krat bolj viskozne od vode (Cone, 1999; Lai in sod., 2009). Do sedaj v literaturi viskoznost kot faktor okolja, ki vpliva na bakterije, še ni bila sistematično proučevana.

V doktorski nalogi smo si za cilj zastavili pokazati, da:

- viskoznost pomembno vpliva na fiziološki status bakterij iz različnih bakterijskih rodov,
- je prodigiozin bakterije *V. ruber* UV zaščitno barvilo, ki izboljša preživetje divjega tipa, kot tudi nepigmentirane mutante te bakterije,
- na sintezo prodigiozina vpliva viskoznost, medcelična komunikacija, metabolni status celic ter koncentracija razpoložljivih intermediatov za sintezo pigmenta,
- viskoznost vpliva na odnose med različnimi bakterijami, ki so v kokulturi.

Rezultati kažejo, da je potrebno viskoznost rastnega medija obravnavati kot pomemben dejavnik okolja, ki lahko vpliva tako na rast in metabolizem različnih bakterij, kot tudi na odpornost proti UV stresu ter občutljivost bakterij na protibakterijsko aktivne molekule.

5.1 VPLIV VISKOZNOSTI NA FIZIOLOGIJO BAKTERIJE *VIBRIO RUBER*

S spremenjanjem viskoznosti medija smo lahko vplivali na primarni in sekundarni metabolizem bakterije *Vibrio ruber*. Celice so bile pri višjih viskoznostih v stresu, na kar kaže povišana metabolna aktivnost ob nespremenjeni hitrosti rasti (slika 7 in 11). Višja produkcija CO₂ je najverjetneje posledica povišane dehidrogenazne aktivnosti (Creach in sod., 2003; Danevčič in Stopar, 2011; Roy in Packard, 2001). Slednja je globalni fiziološki parameter, ki je odvisen od mikrobnega metabolizma v glikolizi, ciklu citronske kisline in elektronski transportni verigi. Pretok ogljika skozi različne glikolitične poti smo spremljali preko aktivnosti posameznih encimov udeleženih pri vstopu v glikolizo (FFK), vstopu v pot pentoze fosfata (GPD) in prehodu iz glikolize v cikel citronske kisline (PK). Medtem ko se aktivnost encimov PK in FFK ni bistveno spremenila, pa je bila aktivnost GPD bistveno višja v celicah, ki so rasle pri visoki viskoznosti. Na podlagi tega sklepamo, da je pretok ogljika skozi pot pentoze fosfata povišan. Ta proces zagotavlja celici redukcijske ekvivalente in ogljikove intermediate za biosintezo. Čeprav se lahko pot pentoze fosfata nadaljuje tudi v CCK, rezultati kažejo, da temu ni tako, kot je razvidno iz aktivnosti encima PK, ki je manj aktiven od encima GPD. Večji pretok ogljika skozi pot pentoze fosfata lahko tudi razloži povišanje nastajanja CO₂ pri višjih viskoznostih. Podoben odziv na nivoju povišane aktivnosti poti pentoze fosfata in nekaterih encimov udeleženih v CCK so opazili v viskoznih biofilmih bakterij *P. aeruginosa* in *S. aureus* (Sauer, 2002; Resch in sod., 2005).

Prodigiozin je sekundarni metabolit, ki je biosintetsko kontroliran s QS (Thomson in sod., 2000; Coulthurst in sod., 2004; Danevčič in Stopar, 2009), proces, na katerega lahko spremembu viskoznosti bistveno vpliva. Zvišanje viskoznosti je spremenilo dinamiko sinteze pigmenta ter tudi sam začetek sinteze le-tega (Sliki 13 in 15, Preglednici 6 in 15). Za aktivacijo QS sistema je potrebna kritična koncentracija signalnih molekul, ki pa je pri višjih viskoznostih verjetno dovolj, saj so celice kumulativno proizvedle približno 6-krat več signalov pri viskoznostih 8,0 in 29,4 mPas. Razlike v začetku sinteze prodigiozina nakazujejo na možnost, da so poleg QS prisotni tudi drugi načini regulacije sinteze pigmenta. Sinteza prodigiozina zahteva dostopnost prekurzorjev, kot so L-prolin, L-serin, S-adenozilmetionin in 2-oktenal (Quadri in Williams, 1973; Wassermann in sod., 1973; Williamson in sod., 2006). Ker niso bili prisotni v minimalnem mediju, so jih morale celice sintetizirati *de novo*. Poleg tega mora biti na razpolago še dovolj redoks ekvivalentov (Trutko in Akimenko, 1989). Prekurzorji in redoks ekvivalenti nastajajo v metabolnih procesih, ki pa so v času pred začetkom intenzivne pigmentacije nižji pri višji viskoznosti.

Pomanjkanje ključnih gradnikov pigmenta, kot smo ga opazili pri aminokislini L-prolin (Preglednica 8), lahko prepreči začetek sinteze prodigiozina kljub potencialno zadostni koncentraciji signalnih molekul. Rezultati kažejo, da eksogeno dodajanje L-proolina in L-metionina lahko premakne začetek pigmentacije na zgodnejši čas (Slika 14), vendar pa ne doseže časa pri najnižji viskoznosti. Zato sklepamo, da je pri tem procesu ključnih še nekaj drugih molekul. Ena izmed teh bi lahko bila celična energija v obliki ATP (Slika 14), ki zviša končno količino nastalega pigmenta, vendar pa ne vpliva pa na dinamiko pigmentacije. Natančna regulacija sinteze rdečega pigmenta je namenjena preprečevanju nepotrebnega porabljanja energije v situacijah, ki niso ugodne za rast celic (Starič in sod., 2010; Williamson in sod., 2006). Rezultati kažejo, da je eden od takih okoljskih stresov povišana viskoznost, saj se intenzivnost metabolizma poviša, sinteza nenujnih sekundarnih metabolitov kot je prodigiozin pa zniža. Tak odziv na nivoju sekundarnega metabolizma so opazili tudi pri glivah iz rodu *Aspergillus*, ki so bile gojene v mediju z želatino kot sredstvom za manipulacijo viskoznosti (Huang in sod., 2009; Kapetanakou in sod., 2011), kjer se je zmanjšala produkcija ohratoksin.

V kombinaciji z drugimi dejavniki okolja, kot sta temperatura in slanost, ki se v naravnem okolju bakterije *V. ruber* nenehno spreminja, predstavlja povišana viskoznost povečan stres za celice. To sklepamo podlagi rezultatov učinkovitosti delovanja celic, ki je bila izračunana kot razmerje med hitrostjo rasti in aktivnostjo metabolizma. Nižja učinkovitost delovanja pri temperaturi 38 °C in viskoznostih nad 8,0 mPas kaže, da morajo celice biti bolj metabolno aktivne za vzdrževanje hitrosti rasti. Pridobljeni rezultati (Slika 16) govorijo v prid hipotezi, da višja temperatura v kombinaciji s povišano viskoznostjo predstavlja večji stres kot samo povišana viskoznost. Tudi v viskoznih medijih z neoptimalno slanostjo bakterija *V. ruber* ne deluje optimalno (Slika 18), kar se je poznalo tudi na nosilnosti okolja (Slika 19). Spremembe v temperaturi in slanosti zahtevajo od celic številne prilagoditve na nivoju sestave celične membrane ali izenačevanju koncentracije soli znotraj in zunaj bakterijske celice (Oren, 2001; Madigan in Martinko, 2004; Danevčič, 2006; Ivančič in sod., 2009; Ivančič, 2012). Če k temu pridružimo še povišano slanost, je to dodaten stres za celice. Ti procesi zahtevajo znaten energetski vložek (Danevčič, 2006), kar se je odražalo na tako na nivoju učinkovitosti delovanja, kot tudi na sintezi prodigiozina (Tabeli 11 in 12).

V medijih z višjo viskoznostjo bakterija *V. ruber* očitno porablja celično energijo za druge, bolj kritične procese. Eden izmed teh je vzdrževanje gibljivosti, ki je pri višjih viskoznostih za paličaste bakterije zmanjšana (Schneider in Doetsch, 1974; Ferrero in Lee.,

1988; Shigematsu in sod., 1998). Nekatere bakterije iz rodu *Vibrio* lahko celo spremenijo tip običkanosti iz polarnega v lateralnega (Schneider in Doetsch, 1974; Greenberg in Canale-Parola, 1977; Belas in sod., 1986; Ferrero in Lee, 1988; Atsumi in sod., 1996), vendar pa se to pri našem sevu ne zgodi (Preglednica 5). Ker je že samo poganjanje bička energetsko zahteven proces (Atsumi in sod., 1992; Kojima in sod., 1999) je možno, da celice investirajo energijo v zagotavljanje mobilnosti, s čimer lahko pridejo do hrani. Brez gibanja celice lahko porabijo hrani, ki jih pridobijo z difuzijo. Ker je difuzija počasen proces na večjih prostorskih skalah, potem ne morejo nadaljevati z rastjo. Da se to ne bi zgodilo, se morajo premakniti na drugo točko, kar pa terja signifikanten energetski vložek (Atsumi in sod., 1992; Kojima in sod., 1999).

Aktivno gibanje celic bi tudi lahko povzročilo spremembe v viskoznosti gojišča (Sokolov in Aranson, 2009) (Slika 8). Poleg tega bi lahko na viskoznost vplivale tudi majhne molekule, kot so amino kisline in enostavni sladkorji ter v mediju prisotni ioni (Mazurkiewitz in sod., 2001; Parker in sod., 1996; Tang in sod., 2005). Bakterije lahko aktivno vplivajo tudi na spremembe viskoznosti biofilmov z izločanjem kloridov, kelatov in uree (Chen in Stewart, 2002). Nekatere od teh molekul bi lahko bile prisotne tudi v okolini celic *V. ruber*, kar bi spremenilo optimalno konformacijo hidroksietil celuloze in znižalo viskoznost rastnega medija v odsotnosti encimske razgradnje le-te (Slika 9). Dokončnega odgovora na to vprašanje še nimamo.

5.2 PRODIGIOZIN ŠČITI BAKTERIJO *VIBRIO RUBER* PRED UV SEVANJEM

Sekundarnim metabolitom je pogosto težko pripisati ekofiziološko vlogo. Pri prodigiozinu je predlaganih ekofizioloških vlog veliko (Haddix in sod., 2008; Hood in sod., 1992; Seganish in Davis, 2005; Burger in Bennet, 1985; Ryazantseva in sod., 1995; Williamson in sod., 2006; Starič in sod., 2010; Borić in sod., 2011). Glede na UV/VIS spekter pigmenta, ki kaže na absorpcijo v UV območju med 240 in 400 nm, je možno, da posreduje zaščito pred UV sevanjem. Podobno je bilo opisano že za nekatere druge pigmente, ki jih proizvajajo bakterije (Scherer in sod., 1988; Ehling-Shultz in sod., 1997; Lemee in sod., 1997; Riesman in Nicholson, 2000; Hullo in sod., 2001; Moeller in sod., 2005; Geng in sod., 2008). V odsotnosti pigmentacije bodisi pred samim začetkom sinteze prodigiozina bodisi pri nepigmentirani mutanti bakterije *V. ruber* so celice bistveno bolj občutljive na UV sevanje (Slika 21 in 23, Preglednica 13). Prehod iz občutljivega v manj

občutljivo stanje celic *V. ruber* WT se zgodi ob začetku sinteze prodigiozina (Slika 22). Poleg tega lahko fiziološko stanje celic ob prehodu v stacionarno fazo rasti poviša odpornost (Morton in Haynes, 1969; Keller in Maxcy, 1984; Berney in sod., 2006), s čemer se ujemajo tudi pridobljeni rezultati (Slike 21 do 23). Zaščitna vloga prodigiozina postaja bolj izrazita pri višjih dozah UV sevanja. Če dodamo ekstrakt prodigiozina celicam nepigmentirane mutante, ga le-te sprejmejo v svoje membrane, kar lahko zviša odpornost proti UV sevanju do ravni divjega tipa (Slika 24). Za popolno izenačitev preživetja divjega tipa in nepigmentirane mutante je slednji potrebno dodati približno toliko pigmenta kot ga sintetizira divji tip. Na podlagi teh rezultatov lahko zaključimo, da pigment prodigiozin spada med skupino pigmentov, ki ščitijo celice pred UV, v kateri so melanin, karotenoidi in scitonemini (Scherer in sod., 1988; Ehling-Shultz in sod., 1997; Lemee in sod., 1997; Riesman in Nicholson, 2000; Hullo in sod., 2001; Moeller in sod., 2005; Geng in sod., 2008). Čeprav ni možno določiti stopnje pigmentacije bakterije *V. ruber* v njenem naravnem okolju, pa sklepamo, da je sinteze prodigiozina sposobna, saj na morskem agarju in umetnem morskem mediju sintetizira rdeči pigment.

Bakterija *V. ruber* je nesporulirajoča bakterija izolirana iz plitkega estuarijskega okolja, podobno kot nekatere druge bakterije iz rodu *Vibrio*, ki so prav tako sposobne sinteze prodigiozina (Farmer in sod., 1998; Shieh in sod., 2003; Kumar in Nair, 2007). Pigmentiranost lahko predstavlja dodatno prednost pri preživetju in zavzemanju ekoloških niš. Potrebno je omeniti, da imajo celice tudi druge mehanizme, ki omogočajo odpornost ali preživetje UV sevanja (Battista in sod., 1999; Nicholson in sod., 2000; Narumi in sod., 2003; Nair in Finkel, 2004), saj vsaj del nepigmentiranih celic preživi (Slika 21). Kljub temu ima pigmentirani sev pri najvišji dozi sevanja približno 1000-krat boljše preživetje, kar kaže na pomembno vlogo prodigiozina. Da bi le-to primerjali z odpornostjo drugi sevov, smo določili IK vrednost. Inaktivacijska konstanta je pri bakteriji *V. ruber* približno 2-krat višja kot pri sporah bakterije *Bacillus* sp. (Moeller in sod., 2005) in približno 3,5-krat višja od IK vrednosti celic bakterije *Deinococcus radiodurans* v stacionarni fazi rasti (Bauermeister in sod., 2009). Ker so spore bistveno bolj odporne na UV stres kot vegetativne celice (Nicholson in sod., 2000) in ker je bakterija *D. radiodurans* izredno odporna bakterija (Battista, 1997), so rezultati presenetljivi, saj kažejo, da prodigiozin nudi celicam bakterije *V. ruber* izrazit visok nivo zaščite.

Neposredno prednost pigmentiranega seva med UV stresom v primerjavi z nepigmentirano mutanto bakterije *V. ruber* smo določali v kokulturah. V odsotnosti UV sevanja je nepigmentirani sev prerasel divji tip, kar je verjetno posledica energetskega vložka v

sintezo prodigiozina pri divjem tipu (Haddix in sod., 2008). Ob obsevanju kokultur z UV pa se pokaže prednost divjega tipa, katerega delež se zvišuje z večanjem doze UV sevanja (Slika 25). Zanimivo je, da prisotnost divjega tipa pomaga pri preživetju nepigmentirane mutante, saj se fitnes slednje bistveno izboljša (Preglednica 14). Prodigiozin tako deluje kot javna dobrina, ki z absorpcijo UV sevanja zniža stres tudi za sosednje celice. Na ta način bi lahko pigment ščitil tudi nekatere patogene seve iz rodu *Vibrio*. To smo preverili v kokulturah bakterij *V. ruber* in *V. harveyi*, vendar pa je bila rast slednje inhibirana. Pridobljeni rezultati nakazujejo, da ima prodigiozin dvostransko vlogo – po eni strani ščiti sorodne celice pred UV sevanjem, po drugi strani pa zaradi svoje protibakterijske aktivnosti inhibira rast drugih bakterijskih sevov (Starč in sod., 2010). Omenjena ekofiziološka vloga lahko prispeva k razlikam v preživetju UV sevanja v vodnih okoljih (Joux in sod., 1999; Arrieta in sod., 2000; Agogue in sod., 2005; Sereda in sod., 2011).

Če povišamo viskoznost okolja ob sočasnem UV stresu, se fitnes obeh sevov, tako divjega tipa kot tudi nepigmentirane mutante bakterije *V. ruber*, izboljša. Pri tem fitnes divjega tipa ostane signifikantno višji (Slika 26). Splošno izboljšanje preživetja lahko pripisemo absorpciji molekul hidroksietil celuloze v UV območju (Priloga E). Nepigmentirana mutanta je pri vseh viskoznostih izkoriščala zaščitni učinek pigmenta, ki ga sintetizira divji tip (Preglednica 15). Zdi se, da je med obema sevoma odnos zajedavski, saj mutanta profitira na račun divjega tipa. Slednji mora vložiti energijo v sintezo pigmenta, kar pri višanju viskoznosti postaja vse težje. To nakazuje, da so kljub povišani viskoznosti celice še vedno v zadostni bližini, da imajo korist od javne dobrine, oziroma da prisotnost pigmenta v splošnem zmanjša efektivno dozo sevanja, ki jo dobijo celice. Pridobljeni rezultati se razlikujejo od študij na bakteriji *P. aeruginosa*, za katero so pokazali, da imajo celice divjega tipa, ki sintetizirajo javno dobrino, pri višjih viskoznostih prednost pred mutantami, saj lahko same koristijo prednosti sinteze sideroforjev, ker jih mutante manj izkoriščajo (Kümmerli in sod., 2009).

5.3 VPLIV VISKOZNOSTI NA FIZIOLOGIJO IZBRANIH BAKTERIJSKIH SEVOV

Bakterija *V. ruber* se je odzvala na povišano viskoznost s spremenjenim primarnim in sekundarnim metabolizmom, zato nas je zanimalo kako pogost je ta odziv pri drugih bakterijskih vrstah. V ta namen smo uporabili tri modelne bakterije, po Gramu negativno bakteriji *V. harveyi* in *E. coli* ter po Gramu pozitivno bakterijo *B. subtilis*. Nobena od teh

bakterij ni bila sposobna encimsko razgraditi hidroksietil celuloze (Priloga G), prav tako pa ni spremenila viskoznosti samih rastnih medijev (Priloga H, Preglednica 16). Tip odziva na povišano viskoznost se med vsemi tremi razlikuje, pri čemer je le odziv bakterije *V. harveyi* podoben tistemu pri bakteriji *V. ruber*. Hitrost rasti bakterije *V. harveyi* je enaka do viskoznosti 16,0 mPas, pri 26,5 mPas pa je 1,6-krat nižja. Za vzdrževanje enake hitrosti rasti morajo celice bakterije *V. harveyi* intenzivneje delati, kar odraža povišana metabolna aktivnost na nivoju endogene respiracije. Pri viskoznosti 26,5 mPas pa očitno tudi povišana respiracija ni dovolj, da bi omogočila vzdrževanje enake hitrosti rasti. Odsotnost zmanjšane hitrosti rasti pri najvišji viskoznosti pri bakteriji *V. ruber* bi lahko bila posledica sprememb v viskoznosti rastnega medija, saj je ta bakterija med rastjo za približno polovico znižala začetno viskoznost medija (Slika 8), medtem ko pri bakteriji *V. harveyi* tega nismo opazili (Preglednica 16). V celicah obeh bakterij iz rodu *Vibrio*, kot tudi pri bakteriji *E. coli* je bila aktivnost encima glukoza-6-fosfat dehidrogenaza najvišja, na podlagi česar lahko sklepamo, da je bila pot pentoze fosfata zelo aktiven metabolni proces. Glede na to, da je aktivnost encima piruvat kinaza, ki je ključen za vstop v cikel citronske kisline, nižja od aktivnosti GPD, lahko sklepamo, da se del ogljika kanalizira v druge metabolne poti. Le-te verjetno celicam zagotavlja potrebne spojine za prilagoditev na višjo viskoznost medija, kar so opazili tudi v biofilmih bakterije *S. aureus* (Resch in sod., 2006).

Kot kažejo rezultati lahko bakterija *E. coli* v območju viskoznosti od 0,8 do 16, 0 mPas deluje normalno, pri viskoznostih višji od teh pa tako hitrost rasti, kot tudi metabolna aktivnost padeta. To bi bila lahko posledica zmanjšane sposobnosti pridobivanja hrani zaradi omejene difuzije hrani, zaradi omejenega gibanja ali kombinacije obeh dejavnikov. To je v skladu s teorijo o negativni viskotaksi bakterije *E. coli*, po kateri naj bi se izogibala visoko viskoznih okoljih (Sherman in sod., 1982), v katerih je njeno plavanje (Greenberg in Canale-Parola, 1977), kot tudi delovanje oteženo.

Edina proučevana bakterija, ki jo povišana viskoznost ni bistveno ovirala pri rasti, je *B. subtilis*. Metabolna aktivnost je bila pri vseh izbranih viskoznostih enaka, medtem ko je se hitrost rasti spremnjala (Slika 27). Bakterija *B. subtilis* najhitreje raste pri viskoznostih med 2,4 in 7,5 mPas, zato se zdi, da bakterija *B. subtilis* pri teh viskoznostih deluje najbolj optimalno. To bi lahko bilo povezano z načinom življenja te bakterije, saj pogosto tvori biofilme (Lemon in sod., 2008). Ker je viskoznost v biofilmu precej višja kot v naših eksperimentih (Hall-Stoodley in sod., 2004; Cheong in sod., 2009), je verjetno prilagojena na spremenjene pogoje difuzije in dostopnosti hrani ter omejenega gibanja. Rezultati

kažejo, da ekološka niša, v kateri se nahajajo bakterije vpliva na tip odziva na povišano viskoznost medija.

5.4 VPLIV VISKOZNOSTI NA SOBIVANJE RAZLIČNIH BAKTERIJSKIH SEVOV IN MEHANIZEM PROTIBAKTERIJSKEGA DELOVANJA PRODIGIOZINA NA BAKTERIJO *E. COLI*

Protibakterijska aktivnost prodigiozina je bila na čistih kulturah bakterij pokazana že večkrat (Gerber, 1975; Boger in Patel, 1987; Williamson in sod., 2006; Starič in sod., 2010; Lee in sod., 2011; Samrot in sod., 2011), zato smo sklepali, da bo tudi v kokulturah različnih bakterij v kombinaciji z bakterijo *V. ruber*, aktivnost pigmenta ostala pomembna. Kot kažejo rezultati je stanje v kokulturah in posledično tip medvrstnega odnosa odvisen od občutljivosti na prodigiozin (Slika 29, Preglednica 17). Bakteriji *V. ruber* najbolj soroden sev *V. ruber* BM je popolnoma odporen proti prodigiozinu, zato enako hitro raste v čisti kulturi kot v kokulturi z divjim tipom. Filogenetsko manj soroden sev *V. harveyi* je bolj občutljiv na pigment, a se še vedno lahko vsaj deloma razmnožuje (Slika 31), najverjetneje zaradi nižje koncentracije prodigiozina nastalega v kokulturah (Priloga J). Le-ta je približno 1,6 do 2,2-krat nižja od MIK vrednosti. Ker pa je to še vedno višje od vrednosti MIK₅₀, je možno tudi, da se difuzija pigmenta v gojišču zniža, zaradi oteženega premikanja pa je tudi srečanje celic obeh sevov v kokulturi manj pogosto. V prisotnosti bakterije *V. ruber* WT imajo ostali testirani sevi, *E. coli*, *B. subtilis* in *Bacillus* sp., izrazito negativen fitnes. Njihov odnos z bakterijo *V. ruber* je torej antagonističen. Rezultati kažejo, da bakterije iz rodu *Vibrio* pa v medsebojnih kokulturah bolj ali manj uspešno sobivajo.

O mehanizmu protibakterijskega delovanja prodigiozina ni veliko znanega, medtem ko so mehanizmi delovanja na evkarijntske celice dobro poznani (Ohkuma in sod., 1998; Seganish in Davis, 2005; Williamson in sod., 2006; Regourd in sod., 2007; Pandey in sod., 2009). Iz MIK in MBC vrednosti za izbrane bakterijske seve lahko sklepamo, da na bakteriji *V. harveyi* in *E. coli* prodigiozin v koncentracijah nižjih od 240 mg/L deluje bakteriostatično, saj se vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije in minimalne baktericidne koncentracije bistveno razlikujeta. Z eksperimenti v čistih kulturah bakterije *E. coli* gojene pri optimalnih pogojih smo pokazali, da prodigiozin v koncentracijah nižjih od MIK vrednosti rast le zaustavi in upočasni splošno hitrost rasti (Slika 35). Koncentracija pigmenta višja od MIK vrednosti (120 µg/mL) pa rast popolnoma ustavi, vendar celice

ohranijo živost. Metabolna aktivnost teh celic je signifikantno znižana (Slika 36), kar povzroči, da imajo celice na voljo manj molekul ATP za energetsko zahtevne procese, kot je sinteza proteinov in celična delitev (Muhkerjee in sod., 1993; Bramhill in Thompson, 1994; Neissel in sod., 1996; Hu in sod., 2002; Jewett in sod., 2008; Jewett in sod., 2009). Dodatno lahko prodigiozin neposredno inhibira aktivnost F-ATP sintaz v membrani bakterije *E. coli*, ki so primarni producenti molekul ATP (Konno in sod., 1998). Omenjena procesa sta verjetno omejena, saj celice *E. coli*, ki so bile tretirane s prodigiozinom, boljše preživijo izpostavljenost antibiotikoma, ki zavirata sintezo proteinov (kanamicin in eritromicin) ter antibiotiku, ki zavira sintezo celične stene (ampicilin) (Slika 39). V nasprotju z znanimi mehanizmi delovanja prodigiozina na evkariontske celice (Ohkuma in sod., 1998; Segalish in Davis, 2005; Williamson in sod., 2006; Regourd in sod., 2007; Pandey in sod., 2009), pa pri bakteriji *E. coli* prodigiozin ne poškoduje DNK. Le-ta očitno ni tarča pigmenta, saj ni prišlo do poškodb DNK, kot tudi ne do signifikantnih razlik v preživetju izpostavljenosti antibiotiku, ki poškoduje DNK (fleomicin) (Slika 39). Opazili smo podaljšanje celic tretiranih s prodigiozinom (Slika 37), kar je značilno za SOS odziv bakterije *E. coli* (Radman, 1974; Aertsen in sod., 2004), saj protein SulA inhibira tvorbo FtsZ obroča. Ker nismo zaznali fluorescence seva *E. coli* s fuzijo promotorja gena *sulA* z zelenim fluorescenčnim proteinom, sklepamo, da SOS odziv ni bil aktiviran po tretmaju s prodigiozinom.

Celice se ne morejo obraniti protibakterijskega delovanja prodigiozina, saj se ta v vsakem primeru vrine v celične membrane (Purkayatsha in Williams, 1960; Vinas in sod., 1983; Wei in Chen, 2005; Meschke in sod., 2011; Ryazantseva in sod., 2012), lahko pa prodre tudi v notranjost celic (Williamson in sod., 2005; Haddix in sod., 2008; Meschke in sod., 2011). Tam se lahko veže na proteinski del ribosomov (Gerber, 1975), kjer bodisi zavira sintezo proteinov ali otežuje vezavo antibiotikov, ki delujejo na ta proces. Čeprav na podlagi pridobljenih rezultatov še ni možno natančno opredeliti mehanizma protibakterijskega delovanja prodigiozina na bakterijo *E. coli*, pa je očitno, da pigment ustavi rast in delitev celic ter zniža njihovo celokupno metabolno aktivnost. Najverjetnejše DNK ni tarča delovanja, medtem ko se predtretiranje s prodigiozinom odraža na učinkovitosti delovanja antibiotikov, ki delujejo na sintezo proteinov in sintezo celične stene. Zanimivo je, da celice niso bile sposobne razviti odpornosti proti prodigiozinu, saj se njihov fitnes med posameznimi tretmaji ne razlikuje (Priloga J). V kolikor celice tretirane s pigmentom precepimo v sveže gojišče brez pigmenta, pa lahko bakterije vzpostavijo normalno rast in delovanje, kar dodatno potrjuje, da prodigiozin deluje kot bakteriostatik.

Ravno obratno kot pri bakteriji *E. coli* se pri obeh sevih iz rodu *Bacillus* vrednosti MIK in MBK ne razlikujeta (Preglednica 17), kar pomeni, da je koncentracija, ki popolnoma inhibira rast obeh bakterij, hkrati te celice tudi inaktivirala do te mere, da na svežem gojišču brez pigmenta niso sposobne rasti. Na podlagi tega lahko sklepamo, da je mehanizem protibakterijskega delovanja prodigiozina na bakteriji *Bacillus* sp. in *B. subtilis* drugačen kot pri bakteriji *E. coli*. Nekateri rezultati kažejo, da celice bakterije *Bacillus* sp. lizirajo, kar je značilno za baktericidne antibiotike (Starič in sod., 2010).

Medvrstni odnosi med različnimi bakterijskimi sevi in bakterijo *V. ruber* se z višanjem viskoznosti ne spreminjajo in ostajajo sobivanje ter amenzalizem. V kokulturah bakteriji *V. ruber* BM ter *V. harveyi* sobivata z bakterijo *V. ruber* WT, medtem ko v kokulturah bakterije *V. ruber* WT in bakterij *E. coli*, *B. subtilis* in *Bacillus* sp. prihaja do amenzalizma. Rezultati kažejo, da vrsta odnosa med bakterijami (sobivanje, parazitizem, altruizem, amenzalizem) ni značilno odvisna od viskoznosti medija, vendar pa se občutljivost na prodigiozin nekaterih testiranih sevov zmanjšuje, kar ima za posledico boljši fitnes. To velja za seva *V. harveyi* in *B. subtilis*, medtem ko višanje fitnesa ni signifikantno pri sevu *E. coli* in sevu *Bacillus* sp. Na preživetje slednjih bi lahko vplival še dodaten protibakterijski mehanizem (MacIntyre in sod., 2010; Starič in sod., 2010).

5.5 SKLEPI

- Povišana viskoznost rastnega medija spremeni fiziološko stanje bakterije *V. ruber*, ki je za vzdrževanje nespremenjene hitrosti rasti prisiljena v intenzivnejši metabolizem in zmanjšano sintezo prodigiozina, ne pa tudi EPS.
- Viskoznost medija bistveno vpliva na dinamiko sinteze prodigiozina, saj se v bolj viskoznih medijih sinteza začne pozneje. Poleg tega se s spremembami viskoznosti spreminja tudi trajanje intenzivne sinteze prodigiozina, saj se le-ta podaljšuje z višanjem viskoznosti, razen pri najvišji viskoznosti minimalnega rastnega medija.
- V kombinaciji z drugimi dejavniki okolja, kot sta slanost in temperatura, povišana viskoznost medija predstavlja večji stres kot povišana viskoznost sama.

- Prodigiozin ščiti bakterijo *V. ruber* in tudi njeno nepigmentirano mutanto pred letalnimi učinki UV sevanja, pri čemer se letalnost UV sevanja zmanjšuje z višanjem viskoznosti medija.
- Bakterija *V. harveyi* ima podoben odziv na višanje viskoznosti kot bakterija *V. ruber*, medtem ko bakterija *E. coli* pri najvišji viskoznosti zniža hitrost rasti in metabolizma. Po drugi strani ima bakterija *B. subtilis* pri najnižji in najvišji viskoznosti enako hitrost rasti in metabolno aktivnost.
- Med proučevanimi bakterijami je imela le bakterija *V. ruber* sposobnost vplivanja na viskoznost rastnega medija v odsotnosti encimske razgradnje hidroksietil celuloze.
- Tip bakterijskih medvrstnih odnosov (npr. sobivanje, amenzalizem) je odvisen od občutljivosti izbranega bakterijskega seva na prodigiozin in se ne spreminja z viskoznostjo medija. Kljub temu sta imeli bakteriji *V. harveyi* in *B. subtilis* boljši fitnes pri višjih viskoznostih.
- Prodigiozin na bakterijo *E. coli* deluje bakteriostatično, medtem ko rezultati MIK in MBK vrednosti kažejo na drugačen način delovanja na bakterije iz rodu *Bacillus*. V koncentraciji 120 µg/mL prodigiozin pri bakteriji *E. coli* signifikantno ustavi rast in razmnoževanje, zniža metabolno aktivnost, ne poškoduje membran in DNK in vpliva na preživetje tretmaja z antibiotiki, ki zavirajo sintezo proteinov in celične stene.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Tekom evolucije so se bakterije prilagodile na številne stresne situacije v njihovem naravnem okolju. Med najbolj preučenimi fizikalno-kemijskimi dejavniki okolja so temperatura, slanost, pH ter dostopnost hranil in kisika, medtem ko je viskoznost okolja relativno spregledan dejavnik. Razen redkih objav je dobro znan le vpliv viskoznosti na gibanje različnih bakterij, poznano pa je tudi, da se fiziološko stanje bakterij v planktonski obliki in v biofilmih bistveno razlikuje. Zato smo si v doktorski nalogi zastavili cilj opredeliti kako sprememb viskoznosti spremeni metabolno aktivnost bakterij *V. ruber*, *V. harveyi*, *E. coli* in *B. subtilis*. Rezultati kažejo, da je v okoljih s srednjo viskoznostjo optimalno delovanje bakterije *B. subtilis* doseženo pri viskoznostih med 2,4 in 7,5 mPas. Tudi bakterija *E. coli* pri omenjenih viskoznostih deluje optimalno, vendar ji z višanjem viskoznosti tako hitrost rasti, kot tudi intenzivnost metabolizma padeta. Obe bakteriji iz rodu *Vibrio* se na povišano viskoznost odzivata podobno, saj je bila njuna metabolna aktivnost bistveno intenzivnejša pri višji viskoznosti medija (8,0 mPas ali več), medtem ko je hitrost rasti ostala približno enaka ali pa je celo padla. Ob tem se je pri bakteriji *V. ruber* znižal nivo sinteze prodigiozina, sekundarnega metabolita, katerega izražanje je kontrolirano z medcelično komunikacijo. Kljub teoretičnim in nekaterim eksperimentalnim rezultatom, na podlagi katerih smo pričakovali, da se bo pigmentacija začela prej v medijih z višjo viskoznostjo, pa so naši rezultati pokazali ravno obratno. Zato sklepamo, da so poleg medcelične komunikacije v regulacijo sinteze prodigiozina udeleženi še drugi dejavniki, kot na primer dostopnost metabolnih intermedirov. Pokazali smo, da pigment ščiti pred letalnim UV sevanjem divji tip in nepigmentirano mutanto bakterije *V. ruber*, medtem ko ostale, manj sorodne bakterije inhibira. V kokulturah bakterije *V. ruber* z bakterijama *V. harveyi* in *B. subtilis* se je njegova protimikrobnna učinkovitost zmanjšala z višanjem viskoznosti. Kljub temu nismo opazili sprememb v tipu bakterijskih medvrstnih odnosov. Na podlagi rezultatov sklepamo, da je način protibakterijskega delovanja prodigiozina na bakterijo *E. coli* bakteriostatičen, medtem ko je lahko za bakteriji iz rodu *Bacillus* drugačen. Pri bakteriji *E. coli* prodigiozin ustavi rast, omeji metabolno aktivnost in celično delitev, vendar ne poškoduje DNK kot je bilo opisano za evkariontske celice. Rezultati odpirajo mnogo novih vprašanj, kot so i) kakšna je raznolikost pri odzivu bakterij na povišano viskoznost medija, ii) kakšen je način zaznavanja sprememb viskoznosti v okolju, iii) kako neencimsko bakterija *V. ruber* zniža viskoznost medija, iv) kakšna je vloga medcelične komunikacije in metabolizma pri regulaciji sinteze prodigiozina ter v)

kakšen je podroben mehanizem protibakterijskega delovanja tega pigmenta na različne bakterije. Pridobljeni rezultati širijo naše znanje o delovanju bakterij v okoljih s srednjo viskoznostjo, ki so pogosti v industriji, biotehnologiji in medicini (na primer človeški mukus). Patogeneza bakterij je tesno povezana z njihovo sposobnostjo gibanja v teh pogojih kot tudi s fiziološkim stanjem, ki smo ga v nalogi proučevali na več modelnih organizmih. Glavni zaključek te disertacije je, da je viskoznost pomemben dejavnik okolja, ki lahko bistveno spremeni fiziološko stanje bakterijskih celic.

6.2 SUMMARY

During their evolution bacteria have adapted to numerous stress conditions in their natural environments. Temperature, pH, salinity as well as nutrient and oxygen availability are among the best studied physico-chemical environmental factors, while viscosity remains understudied. Therefore the main aim of the doctoral thesis was to determine how environmental viscosity affects metabolic activity of *V. ruber*, *V. harveyi*, *E. coli* in *B. subtilis*. Results indicate that *B. subtilis* grows optimally at viscosities between 2,4 in 7,5 mPas. Viscosities higher than 16 mPas suppressed growth and metabolic activity of *E. coli*. On the contrary, both *Vibrio* strains increased their metabolism at viscosities higher than 8,0 mPas, while growth rates remained approximately the same. At high viscosities the production of prodigiosin in *V. ruber* was decreased. Synthesis of prodigiosin is controlled by bacterial communication, a process that has been previously shown to be induced sooner when diffusion is limited. The results show that the induction of prodigiosin synthesis was delayed at increased viscosity, suggesting that additional regulators (for example metabolic intermediates) control pigmentation process in *V. ruber*. Nevertheless, prodigiosin represents a significant ecological advantage for wild type and the non-pigmented mutant of *V. ruber* as they were both protected against lethal effects of UV radiation. At the same time, less related bacterial strains were inhibited. Only *V. harveyi* and *B. subtilis* exhibited improved fitness in co-cultures with *V. ruber* grown at higher viscosities. No changes in the type of bacterial interactions were observed during co-culturing. Our results also imply that prodigiosin acts as a bacteriostatic agent for *E. coli*, while a different mode of action could be assigned for *Bacillus* spp. Prodigiosin inhibited growth and suppressed metabolic activity and cell division in *E. coli* but did not damage DNA. The DNA damages are frequent in eukaryotic cells treated with prodigiosin. These results open new questions as i) the diversity in bacterial response to increased viscosity, ii) how bacteria sense changes in viscosity of the environment, iii) what is the non-

enzymatic mechanism by which *V. ruber* decreases viscosity, iv) the role of bacterial communication and metabolism in regulation of prodigiosin synthesis, and v) the precise mechanism of prodigiosin antibacterial activity on different bacteria. The obtained results expand our knowledge on bacterial physiology in media with intermediate viscosities. Such environments are frequently found in industry, biotechnology and medicine. For example, bacterial pathogenesis is tightly coupled with their ability to move in viscous environments as well as to their physiological status, which was studied in this thesis on several model organisms. The main conclusion of this thesis is that viscosity is an important environmental factor that can cause significant changes in bacterial physiology.

7 VIRI

- Aertsen A., Van Houdt R., Vanoirbeek K., Michiels C.W. 2004. An SOS response induced by high pressure in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 186: 6133-6141.
- Agogué H., Joux F., Obernosterer I., Lebaron P. 2005. Resistance of marine bacterioneuston to solar radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 5282-5289.
- Ahn H.J., La H.J., Forney L.J. 2006. System for determining the relative fitness of multiple bacterial populations without using selective markers. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 7383-7385.
- Alberghini S., Polone E., Corich V., Carlot M., Seno F., Trovato A., Squartini A. 2009. Consequences of relative cellular positioning on quorum sensing and bacterial cell-to-cell communication. *FEMS Microbiology Letters*, 292: 149-161.
- Alihosseini F., Ju K.S., Lango J., Hammock B.D., Sun G. 2008. Antibacterial colorants: characterization of prodiginines and their applications on textile materials. *Biotechnology Progress*, 24: 742-747.
- Allen G.R., Reichelt J.L., Gray P.P. 1983. Influence of environmental factors and medium composition on *Vibrio gazogenes* growth and prodigiosin production. *Applied and Environmental Microbiology*, 45: 1727-1732.
- Allisson K.R., Brynildsen M.P., Collins J.J. 2011. Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature*, 473: 216-221.
- Amblard F., Maggs A.C., Yurke B., Pargellis A.N., Leibler S. 1996. Subdiffusion and anomalous local viscoelasticity in actin networks. *Physics Review Letters*, 77, 21: 4470-4473.
- Anderl J.N., Franklin M.J., Stewart P.S. 2000. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 1818-1824.
- Andersen H.W., Solem C., Hammer K., Jensen P.R. 2001. Twofold reduction of phosphofructokinase activity in *Lactococcus lactis* results in strong decreases in growth rate and glycolytic flux. *Journal of Bacteriology*, 183: 3458-3467.
- Antwi M., Bernaerts K., Van Impe J.F., Geeraerd A.H. 2007. Modelling the combined effects of structured food model system and lactic acid on *Listeria innocua* and *Lactococcus lactis* growth in mono- and co-culture. *International Journal of Food Microbiology*, 120: 71-84.

- Aoust J.Y.D., Gerber N.N. 1974. Isolation and purification of prodigiosin from *Vibrio psychroerythus*. Journal of Bacteriology, 118, 2: 756-757.
- Arrieta J.M., Weinbauer M.G., Herndl G.J. 2000. Interspecific variability insensitivity to UV radiation and subsequent recovery in selected isolates of marine bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 66: 1468-1473.
- Atsumi T., Maekawa Y., Yamada T., Kawagishi I., Imae Y., Homma M. 1996. Effect of viscosity on swimming by the lateral and polar flagella of *Vibrio algynolyticus*. Journal of Bacteriology, 178: 5024-5026.
- Atsumi T., McCartert L., Imae Y. 1992. Polar and lateral flagellar motors of marine *Vibrio* are driven by different ion-motive forces. Nature, 355: 182-184.
- Azambuja P., Feder D., Garcia E.S. 2004. Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. Experimental Parasitology, 107: 89-96.
- Baich A. 1969. Proline synthesis in *Escherichia coli*. A proline-inhibitable glutamic acid kinase. Biochimica et Biophysica Acta, 192: 462-467.
- Bais H.P., Fall R., Vivanco J.M. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. Plant Physiology, 134: 307-319.
- Bandow J.E., Brötz H., Hecker M. 2002. *Bacillus subtilis* tolerance of moderate concentrations of rifampin involves the σB-dependent general and multiple stress response. Journal of Bacteriology, 184: 459-467.
- Bassler B.L. 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. Current Opinion in Microbiology, 2, 6: 582-587.
- Bassler B.L., Greenberg E.P., Stevens A.M. 1997. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. Journal of Bacteriology, 179, 12: 4043-4045.
- Bassler B.L., Losick R. 2006. Bacterially speaking. Cell, 125, 2: 237-246.
- Battista J.R. 1997. Against all odds: the survival strategies of *Deinococcus radiodurans*. Annual Reviews in Microbiology, 51: 203-224.
- Battista J.R., Earl A.M., Park M.J. 1999. Why is *Deinococcus radiodurans* so resistant to ionizing radiation? Trends in Microbiology, 7: 362-365.
- Bauermeister A., Bentchikou E., Moeller R., Rettberg P. 2009. Roles of PprA, IrrE, and RecA in the resistance of *Deinococcus radiodurans* to germicidal and environmentally relevant UV radiation. Archives of Microbiology, 191: 913-918.

- Bausch A.R., Ziemann F., Boulbitch A.A., Jacobson K., Sackmann E. 1998. Local measurements of viscoelastic parameters of adherent cell surfaces by magnetic bead microrheometry. *Biophysical Journal*, 75, 4: 2038-2049.
- Belas R., Simon M., Silverman M. 1986. Regulation of lateral flagella gene transcription in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*, 167: 210-218.
- Bennett J.W., Bentley R. 2000. Seeing red: the story of prodigiosin. *Advances in Applied Microbiology*, 25: 396-402.
- Bentley R., Meganathan R. 1982. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria. *Microbiology Reviews*, 46, 3: 241-280.
- Bergstedt M.S., Hondzo M.M., Cotner J.B. 2004. Effects of small scale fluid motion on bacterial growth and respiration. *Freshwater Biology*, 49: 28-40.
- Berney M., Weilenmann H.U., Ihssen J., Bassin C., Egli T. 2006. Specific growth rate determines the sensitivity of *Escherichia coli* to thermal, UVA and solar disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 2586-2593.
- Boger D.L., Patel M. 1988. Total synthesis of prodigiosin, prodigiosene, and desmethoxyprodigiosin: Diels-Alder reactions of heterocyclic azadienes and development of an effective palladium(II)-promoted 2,2'-bipyrrole coupling procedure. *Journal of Organic Chemistry*, 53, 7: 1405-1415.
- Borić M. 2009. Razvoj nove metode za merjenje mikroviskoznosti v mikrobiologiji. Dipl. delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 55 str.
- Borić M., Danevčič T., Stopar D. 2011. Prodigiosin from *Vibrio* sp. DSM 14379; A new UV-protective pigment. *Microbial Ecology*, 62: 528-536.
- Borić M., Danevčič T., Stopar D. 2012. Viscosity dictates metabolic activity of *Vibrio ruber*. *Frontiers in Microbiology*, 3: 255, doi: 10.3389/fmicb.2012.00255: 10 str.
- Borriello G., Werner E., Roe F., Kim A.M., Ehrlich G.D., Stewart P.S. 2004. Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48: 2659-2664.
- Boulay C., Abasova L., Six C., Vass I., Kirilovsky D. 2008. Occurrence and function of the orange carotenoid protein in photoprotective mechanisms in various cyanobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1777: 1344-1354.
- Boyer R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 634 str.
- Bramhill D., Thompson C.M. 1994. GTP-dependent polymerization of *Escherichia coli* FtsZ protein to form tubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 5813-5817.

- Burger S.R., Bennett J.W. 1985. Droplet enrichment factors of pigmented and nonpigmented *Serratia marcescens*: possible selective function for prodigiosin. *Applied and Environmental Microbiology*, 50: 487-490.
- Butala M., Klose D., Hodnik V., Rems A., Podlesek Z., Klare J.P., Anderluh G., Busby S.J., Steinhoff H.J., Zgur-Bertok D. 2011. Interconversion between bound and free conformations of LexA orchestrates the bacterial SOS response. *Nucleic Acids Research*, 39, 15: 6546-6557.
- Castro A.J. 1967. Antimalarial activity of prodigiosin. *Nature*, 213: 903-904.
- Castro A.J., Gale G.R., Means G.E., Tertzakian G. 1967. Antimicrobial properties of pyrrole derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 10: 29-32.
- Celli J.P., Turner B.S., Afdhal N.H., Keates S., Ghiran I., Kelly C.P., Ewoldt R.H., McKinley G.H., So P., Erranilli S., Bausil R. 2009. *Helicobacter pylori* moves through mucus by reducing mucin viscoelasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106: 14321-14326.
- Chan P. F., Foster S.J., Ingram E., Clements M.O. 1998. *Staphylococcus aureus* alternative sigma factor σ^B controls the environmental stress response but not starvation survival or pathogenicity in a mouse abscess model. *Journal of Bacteriology*, 180: 6082-6089.
- Chen X., Stewart P.S. 2002. Role of electrostatic interactions in cohesion of bacterial biofilms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59: 718-720.
- Chen Y., Yan F., Chai Y., Liu H., Kolter R., Losick R., Guo J.H. 2013. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. *Environmental Microbiology*, 15: 848-864.
- Cheong F.C., Duarte S., Lee S.-H., Grier D.G. 2009. Holographic microrheology of polysaccharides from *Streptococcus mutans* biofilms. *Rheology Acta*, 48: 109-115.
- Choudhary S., Schmidt-Dannert C. 2010. Applications of quorum sensing in biotechnology. *Applied Microbial Biotechnology*, 86: 1267-1279.
- Chugani S.A., Whiteley M., Lee K.M., D'Argenio D.D., Manoil C., Greenberg E.P. 2001. QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 2752-2757.
- Cleaver J.E. 2006. Cells have long experience of dealing with UVC light. *Nature*, 442: 244.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard. 8th ed. Wayne, Clinical and Laboratory Standards Institute: 49 str.

- Cockell C.S., Knowland J. 1999. Ultraviolet radiation screening compounds. *Biology Reviews*, 74: 311-345.
- Cone R. 1999. Mucus. V: *Mucosal immunology*. Ogra P.L., Meschteky M., Lamm M.E., Strober W., Bienenstock J., McGhee J.R. (eds.). San Diego, Academic Press: 43-64.
- Coulthurst S.J., Kurz L.C., Salmond G.P.C. 2004. *luxS* mutants of *Serratia marcescens* defective in autoinducer-2-dependent ‘quorum sensing’ show strain dependent impacts on virulence and production of carbapenem and prodigiosin. *Microbiology*, 150: 1901-1910.
- Cox P.J., Twigg G.I. 1974. Leptospiral motility. *Nature*, 250: 260–261.
- Créach V., Badoux A.C., Bertru G., Le Rouzic B. 2003. Direct estimate of active bacteria: CTC use and limitations. *Journal of Microbiological Methods*, 52: 19-28.
- Cullis P.R., de Kruijff B. 1979. Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 559: 399-420.
- Czárán T., Hoekstra R.F. 2009. Microbial communication, cooperation and cheating: quorum sensing drives the evolution of cooperation in bacteria. *PLoS ONE*, 4, 8: e6655, doi: 10.1371/journal.pone.0006655: 10 str.
- D'Abzac P., Bordas F., Van Hullebusch E., Piet N.L., Guibaud G. 2010. Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from anaerobic granular sludges: comparison of chemical and physical extraction protocols. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85: 1589-1599.
- D'Aoust J.Y., Gerber N.N. 1974. Isolation and purification of prodigiosin from *Vibrio psychroerythrus*. *Journal of Bacteriology*, 118: 756-757.
- Danevčič T. 2006. Vpliv slanosti na energetski metabolizem pri bakteriji *Vibrio* sp. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti: 94 str.
- Danevčič T., Rilfors L., Štrancar J., Lindblom G., Stopar D. 2005. Effects of lipid composition on the membrane activity and lipid phase behaviour of *Vibrio* sp. DSM 14379 cells grown at various NaCl concentrations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1712: 1-8.
- Danevčič T., Stopar D. 2009. Environmental quality determines physiological behaviour of bacteria. V: *Handbook of environmental quality*. Drury E.K., Pridgen T.S. (eds.). New York, Nova Science Publishers, Inc: 349-364.
- Danevčič T., Stopar D. 2011. Asymmetric response of carbon metabolism at high and low salt stress in *Vibrio* sp. DSM14379. *Microbial Ecology*, 62: 198-204.
- Davey M.E., O'Toole G.A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 847-867.

- Davies D.G., Parsek M.R., Pearson J.P., Iglewski B.H., Costerton J.W., Greenberg E.P. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280: 295-298.
- De Kievit T.R., Gillis R., Marx S., Brown C., Iglewski B.H. 2001. Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Their role and expression patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 1865-1873.
- de Kruijff B. 1997. Lipid polymorphism and biomembrane function. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1: 564-569.
- Decho A.W., Frey R.L., Ferry J.L. 2011. Chemical challenges to bacterial AHL signalling in the environment. *Chemistry Reviews*, 111: 86-99.
- Dieser M., Greenwood M., Foreman C.M. 2010. Carotenoid pigmentation in Antarctic heterotrophic bacteria as a strategy to withstand environmental stresses. *Arctic Antarctic Alpine Research*, 42: 396-405.
- Diggles BK. 2000. Luminous vibriosis in rock lobster *Jasus verreauxi* (Decapoda: *Palinuridae*) phyllosoma larvae associated with infection by *Vibrio harveyi*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 43, 2: 127-137.
- Dörr T., Lewis K., Vulic M. 2009. SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *PLoS Genetics*, 5, 12: e1000760, doi:10.1371/journal.pgen.1000760: 9 str.
- Drčar T. 2010. Določanje signalnih molekul in vpliv slanosti na njihovo producijo pri bakteriji *Vibrio* sp. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 52 str.
- Dulla G., Lindow S.E. 2008. Quorum size of *Pseudomonas syringae* is small and dictated by water availability on the leaf surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 3082-3087.
- Dunlap P.V. 1999. Quorum regulation of luminescence in *Vibrio fischeri*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1, 1: 5-12.
- Dunny G.M., Leonard B.A. 1997. Cell-cell communication in gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 51: 527-564.
- Ehling-Shulz M., Bilger W., Scherer S. 1997. UV-B induced synthesis of photoprotective pigments and extracellular polysaccharides in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Journal of Bacteriology*, 179: 1940-1945.
- Evans E.A., Skalak R. 1980. Mechanics and thermodynamics of biomembranes. Boca Raton, CRC Press: 254 str.
- Fajardo A., Martínez J.L. 2008. Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Current Opinion in Microbiology*, 11, 2: 161-167.

- Farmer J.J., Hickman-Brenner F.W., Fanning G.R., Gordon C.M., Brenner D.J. 1988. Characterization of *Vibrio metschnikovii* and *Vibrio gazogenes* by DNA-DNA hybridization and phenotype. *Journal of Clinical Microbiology*, 26: 1993-2000.
- Federle M.J., Bassler B.L. 2003. Interspecies communication in bacteria. *Journal of Clinical Investigation*, 112, 9: 1291-1299.
- Ferrero R.L., Lee A. 1988. Motility of *Campylobacter jejuni* in a viscous environment: Comparison with conventional rod-shaped bacteria. *Journal of General Microbiology*, 134: 53-59.
- Fofonoff N.P. 1962. Physical properties of sea water. V: The sea: ideas and observations on progress in the study of the seas. Vol 1: Physical oceanography. Hill M.N. (ed.). New York, John Wiley and Sons: 22-27.
- Folsom J.P., Richards L., Pitts B., Roe F., Erlich G.D., Parker A., Mazurie A., Stewart P.S. 2010. Physiology of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms as revealed by transcriptome analysis. *BMC Microbiology*, 10: 294, doi:10.1186/1471-2180-10-294: 17 str.
- Foster K.R., Bell T. 2012. Competition, not cooperation, dominates interactions among culturable microbial species. *Current Biology*, 22,19: 1845-1850.
- Foster K.R., Wenseleers T., Ratnieks F.L.W. 2001. Spite: Hamilton's unproven theory. *Annales Zoologici Fennici*, 38: 229-238.
- Foster K.R., Wenseleers, Ratnieks F.L.W. 2005. Kin selection is the key to altrusim. *Trends in Ecology and Evolution*, 21, 2: 57-60.
- Fox M.A., White J.P., Hosie A.H.F., Lodwig E.M., Poole P.S. 2006. Osmotic upshift transiently inhibits uptake via ABC transporters in Gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 188: 5304-5307.
- Francis K., Palsson B.O. 1997. Effective intercellular communication distances are determined by the relative time constants for cyto/chemokine secretion and diffusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94: 12258-12262.
- Fuqua C., Greenberg E.P. 1998. Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. *Current Opinion in Microbiology*, 1, 2: 183-189.
- Fuqua W.C., Winans S.C. 1994. A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *Journal of Bacteriology*, 176: 2796-2806.
- Fuqua W.C., Winans S.C., Greenberg E.P. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176: 269-275.

- Fuqua C., Winans S.C., Greenberg E.P. 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annual Review of Microbiology*, 50: 727-751.
- Fushimi K., Verkman A.S. 1991. Low viscosity in the aqueous domain of cell cytoplasm measured by picosecond polarization microfluorimetry. *Journal of Cell Biology*, 112: 719-725.
- Fux C.A., Costerton J.W., Stewart P.S., Stoodley P. 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology*, 13: 34-40.
- Gantner S., Schmid M., Dürr C., Schuhegger R., Steidle A., Hutzler P., Langebartels C., Eberl L., Hartmann A., Dazzo F.B. 2006. *In situ* quantification of the spatial scale of calling distances and population density-independent N-acylhomoserine lactone-mediated communication by rhizobacteria colonized on plant roots. *FEMS Microbiology Ecology*, 56: 188-194.
- Gao Z.-M., Xiao J., Wang X.-N., Ruan L.-W., Chen X..L., Zhang Y.-Z. 2012. *Vibrio xiamenensis* sp. nov., a novel cellulase-producing bacterium isolated from mangrove soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62: 1958-1962.
- Garrity G.M., Bell J.A., Lilburn T.G. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. Release 5.0. New York, Springer, doi:10.1007/bergeysoutline200405: 399 str.
http://www.bergeys.org/outlines/bergeysoutline_5_2004.pdf (21.1.2013)
- Geng J., Yu S.B., Wan X., Wang X.Y., Shen P., Zhou P., Chen X.D. 2008. Protective action of bacterial melanin against DNA damage in full UV spectrums by a sensitive plasmid-based noncellular system. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70: 1151-1155.
- Gerber N.N. 1971. Prodigiosin-like pigments from *Actinomadura (Nocardia) pelletieri*. *Journal of Antibiotics*, 24, 9: 636-640.
- Gerber N.N. 1975. Prodigiosin-like pigments. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 3: 469-485.
- Gilbert P., Jones M.V., Allison D.G., Heys S., Maira T., Wood P. 1998. The use of poloxamer hydrogels for the assessment of biofilm susceptibility towards biocide treatments. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 985-991.
- Gisler T., Weitz D. 1998. Tracer microrheology in complex fluids: Dynamic aspects of colloids and interfaces. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 3, 6: 586-592.

- Gnezda-Meijer K., Mahne I., Poljšak-Prijatelj M., Stopar D. 2006. Host physiological status determines phage-like particle distribuiton in the lysate. FEMS Microbiology Ecology, 55, 1: 135-145.
- Goosen N., Moolenaar G.F. 2008. Repair of UV damage in bacteria. DNA Repair, 7, 3: 353-379.
- Götz T., Windhovel U., Böger P., Sandmann G. 1999. Protection of photosynthesis against UV-B radiation by carotenoids in transformants of the cyanobacterium *Synechococcus* PCC 7942. Plant Physiology, 120: 599-604.
- Greenberg E.P., Canale-Parola E. 1977. Motility of flagellated bacteria in viscous environments. Journal of Bacteriology, 132: 356-358.
- Haddix P.L., Jones S., Patel P., Burnham S., Knights K., Powell J.N., LaForm A. 2008. Kinetic analysis of growth rate, ATP, and pigmentation suggests an energy-spilling function for the pigment prodigiosin of *Serratia marcescens*. Journal of Bacteriology, 190: 7453-7763.
- Hagen S.J. 2010. Solvent viscosity and friction in protein folding dynamics. Current Protein and Peptide Science, 11, 5: 385-395.
- Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nature Reviews Microbiology, 2: 95-108.
- Hammer B.K., Bassler B.L. 2003. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. Molecular Microbiology, 50: 101-104.
- Hanna K., Bengis-Garber C., Kushner D.J., Kogut M., Kates M. 1984. The effect of salt concentration on phospholipid and fatty acid composition of the moderate halophile *Vibrio costicola*. Canadian Journal of Microbiology, 30: 669-675.
- Hanzelka B.L., Greenberg E.P. 1996. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: evidence that S-adenosylmethionine is the amino acid substrate for autoinducer synthesis. Journal of Bacteriology, 178: 5291-5294.
- Hasar H., Kinaci C. Ünlü A., Toğrul H., Ipak U. 2004. Rheological properties of activated sludge in a sMBR. Biochemical Engineering Journal, 20: 1-6.
- Henke J.M., Bassler B.L. 2004. Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. Journal of Bacteriology, 186: 6902-6914.
- Hense B.A., Kuttler C., Muller J., Rothbauer M., Hartmann A., Kreft J.-U. 2007. Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? Nature Reviews Microbiology, 5: 230-239.
- Holzinger A., Nagendra-Prasad D., Huys G. 2011. Plant protection potential and ultrastructure of *Bacillus subtilis* strain 3A25. Crop Protection, 30: 739-744.

- Hong H.A., Khaneja R., Tam N.M., Cazzato A., Tan S., Urdaci M., Brisson A., Gasbarrini A., Barnes I., Cutting S.M. 2009. *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract. Research in Microbiology, 160: 134-143.
- Hood D.W., Heidstra R., Swoboda U.K., Hodgson D.A. 1992. Molecular genetic analysis of proline and tryptophan biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): interaction between primary and secondary metabolism- a review. Gene, 115: 5-12.
- Horswill A.R., Stoodley P., Stewart P.S., Parsek M.R. 2007. The effect of the chemical, biological and physical environment on quorum sensing in structured microbial communities. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 387: 371-380.
- Hu Z., Gogol E.P., Lutkenhaus J. 2002. Dynamic assembly of MinD on phospholipid vesicles regulated by ATP and MinE. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99: 6761-6766.
- Huang B., Chapman B., Wilson M., Hocking A.D. 2009. Effect of agar concentration on the matric potential of glycerol agar media and the germination and growth of xerophilic and non-xerophilic fungi. International Journal of Food Microbiology, 133: 179-185.
- Hubbard R., Rimington C. 1950. The biosynthesis of prodigiosin, the tripyrrylmethene pigment from *Bacillus prodigiosus* (*Serratia marcescens*). Biochemical Journal, 46, 2: 220-225.
- Hudault S., Guignot J., Servin A.L. 2001. *Escherichia coli* strains colonizing the gastrointestinal tract protect germ-free mice against *Salmonella typhimurium* infection. Gut, 49: 47-55.
- Hullo M.F., Moszer I., Danchin A., Martin-Verstraete I. 2001. CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. Journal of Bacteriology, 183: 5426-5430.
- Ivancic T., Vodovnik M., Marinsek-Logar R., Stopar D. 2009. Conditioning of the membrane fatty acid profile of *Escherichia coli* during periodic temperature cycling. Microbiology, 155: 3461-3463.
- Ivančič T. 2012. Fizioloski odziv bakterije *Escherichia coli* na periodično spremenjanje temperature. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti: 81 str.
- Jacob M., Schmid F.X. 1999. Protein folding as a diffusional process. Biochemistry, 38: 13773-13779.
- Jakubovics N.S. 2010. Talk of the town: interspecies communication in oral biofilms. Molecular Oral Microbiology, 25: 4-14.

- Jefferson K.K., Goldmann D.A., Pier G.B. 2005. Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 6: 2467-2473.
- Jewett M.C., Calhoun K.A., Voloshin A., Wuu J.J., Swartz J.R. 2008. An integrated cell-free metabolic platform for protein production and synthetic biology. *Molecular Systematic Biology*, 4: 220.
- Jewett M.C., Miller M.L., Chen Y., Swartz J.R. 2009. Continued protein synthesis at low [ATP] and [GTP] enables cell adaptation during energy limitation. *Journal of Bacteriology*, 191: 1083-1091.
- Joux F., Jeffrey W.H., Lebaron P., Mitchell D.L. 1999. Marine bacterial isolates display diverse responses to UV-B radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 3820-3827.
- Kaiser G.E., Doetsch R.N. 1975. Enhanced translational motion of *Leptospira* in viscous environments. *Nature*, 255: 656-657.
- Kao H.P., Abney J.R., Verkman A.S. 1993. Determinants of the translational diffusion of a small solute in cytoplasm. *Journal of Cell Biology*, 203: 313-321.
- Kaper J.B., Sperandio V. 2005. Bacterial cell-to-cell signaling in the gastrointestinal tract. *Infection and Immunity*, 73, 6: 3197-3209.
- Kapetanakou A.E., Ampavi A., Yanniotis S., Drosinos E.H., Skandamis P.N. 2011. Development of a model describing the effect of temperature, water activity and (gel) structure on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* *in vitro* and evaluation in food matrices of different viscosity. *Food Microbiology*, 28: 727-735.
- Kawagishi I., Imagawa M., Imae Y., McCarter L., Homma M. 1996. The sodium-driven polar flagellar motor of marine *Vibrio* as the mechanosensor that regulates lateral flagellar expression. *Molecular Microbiology*, 20: 693-699.
- Keller L.C., Maxcy R.B. 1984. Effect of physiological age on radiation resistance of some bacteria that are highly radiation resistant. *Applied and Environmental Microbiology*, 47: 915-918.
- Kemblowski Z., Kristiansen B. 1986. Rheometry of fermentation liquids. *Biotechnology and Bioengineering*, 28: 1474-1483.
- Keyhani N.O., Roseman S. 1999. Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1473: 108-122.
- Kim B.H., Gadd A.M. 2008. *Bacterial physiology and metabolism*. New York, Cambridge University Press: 529 str.

- Kim U.O., Hahn K.S., Park Y.-H., Kim Y.J. 1999. cAMP-mediated catabolite repression and electrochemical potential-dependent production of an extracellular amylase in *Vibrio alginolyticus*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 63: 288-292.
- Kodaka H., Armfield A. Y., Lombard G. L., Dowell V. R. 1982. Practical procedure for demonstrating bacterial flagella. *Journal of Clinical Microbiology*, 16: 948-952.
- Kojima S., Yamamoto K., Kawagishi I., Homma M. 1999. The polar flagellar motor of *Vibrio cholerae* is driven by an Na^+ motive force. *Journal of Bacteriology*, 181: 1927-1930.
- Konno H., Matsuya H., Okamoto M., Sato T., Tanaka Y., Yokoyama K., Kataoka T., Nagai K., Wasserman H.H., Ohkuma S. 1998. Prodigiosins uncouple mitochondrial and bacterial F-ATPases: Evidence for their H^+/Cl^- symport activity. *Journal of Biochemistry*, 124: 547-556.
- Kostenko V., Ceri H., Martinuzzi R.J. 2007. Increased tolerance of *Staphylococcus aureus* to vancomycin in viscous media. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 51: 277-288.
- Krajnc M. 2011. Vpliv okoljskih dejavnikov na produkcijo zunajceličnih signalnih molekul pri naravnem izolatu *Vibrio* sp. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 40 str.
- Kumar N.R., Nair S. 2007. *Vibrio rhizosphaerae* sp. nov., a red-pigmented bacterium that antagonizes phytopathogenic bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 2241-2246.
- Kümmerli R., Brown S.P. 2010. Molecular and regulatory properties of a public good shape the evolution of cooperation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 44: 18921-18926.
- Kümmerli R., Griffin A.S., West S.A., Buckling A., Harrison F. 2009. Viscous medium promotes cooperation in the pathogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B Biological Sciences*, 276: 3531-3538.
- Kunzelmann K., Mall M. 2002. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiology Reviews*, 82, 1: 245-289.
- Lai S.K., Wang Y.-Y., Wirtz D., Hanes J. 2009. Micro- and macrorheology of mucus. *Advances in Drug Delivery Reviews*, 61: 86-100.
- Larsen M.H., Blackburn N., Larsen J.L., Olsen J.E. 2004. Influence of temperature, salinity and starvation on the motility and chemotactic response of *Vibrio anguillarum*. *Microbiology*, 150: 1283-1290.

- Le Gac M., Doeblei M. 2010. Environmental viscosity does not affect the evolution of cooperation during experimental evolution of colicogenic bacteria. *Evolution*, 64: 522-533.
- Lee J.S., Kim Y.S., Park S., Kim J., Kang S.J., Lee M.H., Ryu S., Choi J.M., Oh T.K., Yoon J.H. 2011. Exceptional production of both prodigiosin and cycloprodigiosin as major metabolic constituents by a novel marine bacterium, *Zooshikella rubidus* S1-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 4967-73.
- Lee S.Y. 1996. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, 14: 98–105.
- Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M. 2004. *Principles in biochemistry*. 4th ed. New York, Worth Publishers, Inc.: 1013 str.
- Lemee L., Peuchant E., Clerc M. 1997. Deinoxanthin: A new carotenoid isolated from *Deinococcus radiodurans*. *Tetrahedron*, 53:919-926.
- Lemon K.P., Earl A.M., Vlamakis H.C., Aguilar C., Kolter R. 2008. Biofilm development with an emphasis on *Bacillus subtilis*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322: 1-16.
- Lerat E., Moran N.A. 2004. The evolutionary history of quorum-sensing systems in bacteria. *Molecular Biology Evolution*, 21: 903-913.
- Lewis K. 2000. Programmed death in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 503-514.
- Li M., Kim T.-J., Kwon H.J., Suh J.-W. 2008. Effects of extracellular ATP on the physiology of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *FEMS Microbiology Letters*, 286: 24-31.
- Li X.-G., Cao H.-B., Wu J.-C., Zhong F.-L., Yu K.T. 2002. Enhanced extraction of extracellular polymeric substances from biofilms by alternating current. *Biotechnology Letters*, 24: 619-621.
- Linares J.F., Gustafsson I., Baquero F., Martinez J.L. 2006. Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 103, 51: 19484-19489.
- Lindblom G., Rilfors L. 1992. Nonlamellar phases formed by membrane lipids. *Advances in Colloid and Interface Science*, 41: 101-125.
- Liu Z., Stirling F.R., Zhu J. 2007. Temporal quorum-sensing induction regulates *Vibrio cholerae* biofilm architecture. *Infection and Immunity*, 75: 122-126.
- MacIntyre D.L., Miyata S.T., Kitaoka M., Pukatzki S. 2010. The *Vibrio cholerae* type VI secretion system displays antimicrobial properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107: 19520–19524.

- Madigan M.T., Martinko J.M. 2006. Brock biology of microorganisms. 11th ed. Upper Saddle River, New Jersey, Pearson Prentice Hall: 992 str.
- Mansson M., Gram L., Larsen T.O. 2011. Production of bioactive secondary metabolites by marine *Vibrionaceae*. *Marine Drugs*, 9: 1440-1468.
- Mason T.G., Ganesan K., van Zanten J.H., Wirtz D., Kuo S.C. 1997. Particle tracking microrheology of complex fluids. *Physical Review Letters*, 79: 3282-3285.
- Mazurkiewitz J., Rebilas K., Tomasik P. 2001. Viscosity of solutions of dextrans with selected sweeteners. *European Food Research Technology*, 213: 470-473.
- McCarter L.L. 2001. Polar flagellar motility of the *Vibrionaceae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 3: 445-462.
- McCarter L.L. 2004. Dual flagellar systems enable motility under different circumstances. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 7: 18-29.
- McCool J.D., Long E., Petrosino J.F., Sandler H.A., Rosenberg S.M., Sandler S.J. 2004. Measurement of SOS expression in individual *Escherichia coli* K-12 cells using fluorescence microscopy. *Molecular Microbiology*, 53: 1343-1357.
- McFall-Ngai M.J. 1994. Animal-bacterial interactions in the early life history of marine invertebrates: The *Euprymna scolopes/Vibrio fischeri* symbiosis. *American Zoologist*, 34: 554-561.
- Meschke H., Walter S., Schrempf H. 2012. Characterization and localization of prodiginines from *Streptomyces lividans* suppressing *Verticillium dahliae* in the absence or presence of *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Microbiology*, 14: 940-52.
- Miller G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428.
- Miller M.B., Bassler B.L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55: 165-199.
- Miller M.B., Skorupski K., Lenz D.H., Taylor R.K., Bassler B.L. 2002. Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. *Cell*, 110: 303-314.
- Moeller R., Horneck G., Facius R., Stackebrandt E. 2005. Role of pigmentation in protecting *Bacillus* sp. endospores against environmental UV radiation. *FEMS Microbiology Ecology*, 51: 231-236.
- Moons P., Michiels C.W., Aertsen A. 2009. Bacterial interactions in biofilms. *Critical Reviews in Microbiology*, 35: 157-168.
- Morikawa M. 2006. Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101: 1-8.

- Morton R.A., Haynes R.H. 1969. Changes in the ultraviolet sensitivity of *Escherichia coli* during growth in batch cultures. *Journal of Bacteriology*, 97: 1379-1385.
- Muhkerjee A., Dai K., Lutkenhaus J. 1993. *Escherichia coli* cell division protein FtsZ is a guanine nucleotide binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 1053-1057.
- Nair S., Finkel S.E. 2004. Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase. *Journal of Bacteriology*, 186: 4192-4198.
- Nakamura S., Adachi Y., Goto T., Magariyama Y. 2006. Improvement in motion efficiency of the spirochete *Brachyspira pilosicoli* in viscous environments. *Biophysical Journal*, 90: 3019-3026.
- Narumi I. 2003. Unlocking radiation resistance mechanisms: still a long way to go. *Trends in Microbiology*, 11: 422-425.
- Neissel O.M., De Mattos M.J.T., Tempest D.W. 1996. Growth yield and energy distribution. V: *Escherichia coli* and *Salmonella*, cellular and molecular biology. Vol. 2. Neidhardt F.C., Curtiss R., Ingraham J.L., Lin E.C.C., Low K.B., Magasanik B., Reznikoff W.S., Riley M., Schaechter M., Umbarger H.E. (eds.). Washington, ASM Press: 1683-1692.
- Nelson P. 2003. Biological physics: Energy, information, life. New York, WH Freeman and Company: 600 str.
- Nemet B.A., Shabtai Y., Cronin-Golomb M. 2002. Imaging microscopic viscosity with confocal scanning optical tweezers. *Optics Letters*, 27, 4: 264-266.
- Nenninger A., Mastroianni G., Mullineaux C.W. 2010. Size dependence of protein diffusion in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 192: 4535-4540.
- Newman D.J., Hill R.T. 2006. New drugs from marine microbes: the tide is turning. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33: 539-544.
- Nicholson W.L., Munakata N., Horneck G., Melosh H.J., Setlow P. 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 548-572.
- Nielsen H., Hvidt S., Sheits C.A., Janmey P.A. 2004. Elastic contributions dominate the viscoelastic properties of sputum from cystic fibrosis patients. *Biophysical Chemistry*, 112: 193-200.
- Novick R.P., Muir T.W. 1999. Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 1: 40-45.

- Obidi O.F., Aboaba O.O., Makanjuola M.S., Nwachukwu S.C.U. 2009. Microbial evaluation and deterioration of paints and paint products. *Journal of Environmental Biology*, 30: 835-840.
- Odić D., Turk V., Stopar D. 2007. Environmental stress determines the quality of bacterial lysate and its utilization efficiency in a simple microbial loop. *Microbial Ecology*, 53: 639-649.
- Ohkuma S., Sato T., Okamoto M., Matsuya H., Arai K., Kataoka T., Nagai K., Wasserman H.H. 1998. Prodigiosins uncouple lysosomal vacuolar-type ATPase through promotion of H^+/Cl^- symport. *Biochemical Journal*, 15: 731-741.
- Okamoto H., Sato Z., Sato M., Koiso Y., Iwasaki S., Isaka M. 1998. Identification of antibiotic red pigments of *Serratia marcescens* F-1-1, a biocontrol agent of damping-off of cucumber, and antimicrobial activity against other plant pathogens. *Annual Phytopathological Society of Japan*, 64: 294-298.
- Oren A. 2001. The bioenergetic basis for the decrease in metabolic diversity at increasing salt concentrations: implications for the functioning of salt lake ecosystems. *Hydrobiologia*, 466: 61-72.
- Osterman N. 2009. Študij viskoelastičnih lastnosti, meddelčnih potencialov in samourejanja v mehki snovi z magneto-optično pinceto. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za matematiko in fiziko, Oddelek za fiziko: 147 str.
- Padilla L., Krämer R., Stephanopoulos G., Agosin E. 2004. Overproduction of trehalose: heterologous expression of *Escherichia coli* trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:370-376.
- Pandey R., Chander R., Sainis K.B. 2009. Prodigiosins as anti cancer agents: Living up to their name. *Current Pharmaceutical Design*, 15: 732-741.
- Parker D.L., Schram B.R., Plude J.L., Moore R.E. 1996. Effect of metal cations on the viscosity of a pectin-like capsular polysaccharide from the cyanobacterium *Microcystis flos-aquae* C3-40. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1208-1213.
- Parry S., Palmers S. 2002. *E. coli*: Environmental health issues of VTEC O157. London; New York, Spon Press: 192 str.
- Parsek M.R., Greenberg E.P. .2000. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97: 8789-8793.

- Perego M., Hoch J.A. 1996. Cell-cell communication regulates the effects of protein aspartate phosphatases on the phosphorelay controlling development in *Bacillus subtilis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93, 4: 1549-1553.
- Pérez-Tomás R., Montaner B., Llagostera E., Soto-Cerrato V. 2003. The prodigiosins, proapoptotic drugs with anticancer properties. Biochemical Pharmacology, 66: 1447-1452.
- Pesci E.C., Milbank J.B., Pearson J.P., McKnight S., Kende A.S., Greenberg E.P., Iglewski B.H. 1999. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96, 20: 11229-11234.
- Petrino M.G., Doetsch R.N. 1978. 'Viscotaxis', a new behavioural response of *Leptospira interrogans* (biflexa) strain B16. Journal of General Microbiology, 109, 1: 113-117.
- Piletska E.V., Stavroulakis G., Karim K., Whitcombe M.J., Chianella I., Sharma A., Eboigbodin K.E., Robinson G.K., Piletsky S.A. 2010. Attenuation of *Vibrio fischeri* quorum sensing using rationally designed polymers. Biomacromolecules, 11: 975-980.
- Prigent-Combaret C., Vidal O., Dorel C., Lejeune P. 1999. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, 181, 19: 5993-6002.
- Purkayastha M., Williams R.P. 1960. Association of pigment with the cell envelope of *Serratia marcescens* (*Chromobacterium prodigiosum*). Nature, 187: 349-350.
- Qadri S.M., Williams R.P. 1973. Role of methionine in biosynthesis of prodigiosin by *Serratia marcescens*. Journal of Bacteriology, 116: 1191-1198.
- Qiu X., Sundin G.W., Chai B., Tiedje J.M. 2004. Survival of *Shewanella oneidensis* MR-1 after UV radiation exposure. Applied and Environmental Microbiology, 70: 6435-6443.
- Radmacher M., Fritz M., Hausma P. 1995. Imaging soft samples with the atomic force microscope: gelatin in water and propanol. Biophysical Journal, 69, 1: 264-270.
- Radman M. 1974. Phenomenology of an inducible mutagenic DNA repair pathway in *Escherichia coli*: SOS repair hypothesis. V: Molecular and environmental aspects of mutagenesis. Prakash L., Sherman F., Miller C., Lawrence C., Tabor H.W (eds.). Springfield, Charles C. Thomas Publisher: 128-142.
- Rasmussen A.A., Søgaard-Andersen L. 2003. TodK, a putative histidine protein kinase, regulates timing of fruiting body morphogenesis in *Myxococcus xanthus*. Journal of Bacteriology, 185: 5452-5464.

- Rastogi R.P., Richa, Sinha R.P., Singh S.P., Häder D.P. 2010. Photoprotective compounds from marine organisms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37: 537-558.
- Redfield R.J. 2002. Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends in Microbiology*, 10: 365-370.
- Regourd J., Ali A.A., Thompson A. 2007. Synthesis and anti-cancer activity of C-ring-functionalized prodigiosin analogues. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50: 1528-1536.
- Reid G., Howard J., Gan B.S. 2001. Can bacterial interference prevent infection? *Trends in Microbiology*, 9: 424-428.
- Resch A., Leicht S., Saric M., Pasztor L, Jakob A., Götz F., Nordheim A. 2006. Comparative proteome analysis of *Staphylococcus aureus* biofilms and planktonic cells and correlation with transcriptome profiling. *Proteomics*, 6: 1867-1877.
- Resch A., Rosenstein R., Nerz C., Götz F. 2005. Differential gene expression profiling of *Staphylococcus aureus* cultivated under biofilm and planktonic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 2663-2676.
- Riesman P.J., Nicholson W.L. 2000. Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 620-626.
- Riley M.A., Chavan M.A. 2007. Bacteriocins: ecology and evolution. Heidelberg, Springer: 150 str.
- Rönsch H., Krämer R., Morbach S. 2003. Impact of osmotic stress on volume regulation, cytoplasmic solute composition and lysine production in *Corynebacterium glutamicum* MH20-22B. *Journal of Biotechnology*, 104: 87-97.
- Roy S.O., Packard T.T. 2001. CO₂ production rate predicted from isocitrate dehydrogenase activity, intracellular substrate concentration and kinetic constants in the marine bacterium *Pseudomonas nautica*. *Marine Biology*, 138: 1251-1258.
- Rubin B.K. 2007. Mucus structure and properties in cystic fibrosis. *Paediatric Respiratory Reviews*, 8: 4-7.
- Ruby J.D., Charon N.W. 1998. Effect of temperature and viscosity on the motility of spirochete *Treponema denticola*. *FEMS Microbiology Letters*, 169: 251-254.
- Rudner D.Z., LeDeaux J.R., Ireton K., Grossman A.D. 1991. The spoOK locus of *Bacillus subtilis* is homologous to the oligopeptide permease locus and is required for sporulation and competence. *Journal of Bacteriology*, 173, 4: 1388-1398.

- Ryazantseva I.N., Andreyeva I.N., Klementyeva G.S., Ogorodnikova T.I., Petrov V.Y. 1995. Pigment-dependent light influence on the energetics of *Serratia marcescens*. *Thermochimica Acta*, 251: 63-67.
- Ryazantseva I.N., Saakov V.S., Andreyeva I.N., Ogorodnikova T.I., Zuev Y.F. 2012. Response of pigmented *Serratia marcescens* to the illumination. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 106:18-23.
- Sakuragi Y., Kolter R. 2007. Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 189: 5383-5386.
- Sampedro J.G., Muñoz-Clares R.A., Uribe S. 2002. Trehalose-mediated inhibition of the plasma membrane H+-ATPase from *Kluyveromyces lactis*: dependence on viscosity and temperature. *Journal of Bacteriology*, 184, 16: 4384-4391.
- Sanin F.D. 2002. Effect of solution physical chemistry on the rheological properties of activated sludge. *Water SA*, 28: 207-212.
- Sauer K., Camper A.K., Ehrlich G.D., Costerton J.W., Davies D.G. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology*, 184, 4: 1140-1154.
- Saxena D., Ben-Dov E., Manasherob R., Barak Z., Boussiba S., Zaritsky A. 2002. A UV tolerant mutant of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* producing melanin. *Current Microbiology*, 44: 25-30.
- Schaechter M., Ingraham J.L., Neidhardt F.C. 2006. *Microbe*. Washington, ASM Press: 534 str.
- Schauder S., Bassler B.L. 2001. The languages of bacteria. *Genes and Development*, 15: 1468-1480.
- Scherer S., Chen T.W., Boger P. 1988. A new UV-A/B protecting pigment in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Plant Physiology*, 88: 1055-1057.
- Schneider W.R., Doetsch R.N. 1974. Effect of viscosity on bacterial motility. *Journal of Bacteriology*, 117:696-701.
- Seganish J.L., Davis J.T. 2005. Prodigiosin is a chloride carrier that can function as an anion exchanger. *Chemical Community*, 46: 5781-5783.
- Sereda J.M., Vandergucht D.M., Hudson J.J. 2011. Disruption of planktonic phosphorus cycling by ultraviolet radiation. *Hydrobiologia*, 665: 205-217.
- Sherman M.Y., Timkina E.O., Glagolev A.N. 1982. Viscosity taxis in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 13: 137-140.
- Shieh W.Y., Chen Y.W., Chaw S.M., Chiu H.H. 2003. *Vibrio ruber* sp. nov., a red, facultatively anaerobic, marine bacterium isolated from sea water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 479-484.

- Shigematsu M., Umeda A., Fujimoto S., Amako K. 1998. Spirochaete-like swimming mode of *Campylobacter jejuni* in a viscous environment. *Journal of Medical Microbiology*, 47: 521-526.
- Shoesmith J.G. 1960. The measurement of bacterial motility. *Journal of General Microbiology*, 22: 528-535.
- Showalter R.E., Martin M.O., Silverman M.R. 1990. Cloning and nucleotide sequence of luxR, a regulatory gene controlling bioluminescence in *Vibrio harveyi*. *Journal of Bacteriology*, 172: 2946-2954.
- Shrout J.D., Chopp D.L., Just C.L., Hentzer M., Givskov M., Parsek M.R. 2001. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Molecular Microbiology*, 62: 1264-1277.
- Shrout J.D., Tolker-Nielsen T., Givskov M., Parsek M.R. 2011. The contribution of cell-cell signaling and motility to bacterial biofilm formation. *MRS Bulletin*, 36: 367-373.
- Siezen R.J. 2011. Microbial sunscreens. *Microbial Biotechnology*, 4: 1-7.
- Sinensky M. 1974. Homeoviscous adaptation – a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71: 522-525.
- Sinha R.P., Häder D.P. 2008. UV-protectants in cyanobacteria. *Plant Science*, 174: 278-289.
- Sokolov A., Aranson I.S. 2009. Reduction of viscosity in suspension of swimming bacteria. *Physical Review Letters*, 103: 148101-148104.
- Someya N., Nakajima M., Hirayae K., Hibi T., Akutsu K. 2001. Synergistic antifungal activity of chitinolytic enzymes and prodigiosin produced by biocontrol bacterium, *Serratia marcescens* strain B2 against gray mold pathogen, *Botrytis cinerea*. *Journal of General Plant Pathology*, 67: 312-317.
- Spormann A.M. 2008. Physiology of microbes in biofilms. V: Bacterial biofilms. Romeo T. (ed.). Berlin, Springer-Verlag: 17-36.
- Srivastava A., Verkman G. 1991. Cell type and spatial location dependence of cytoplasmic viscosity measured by time-resolved fluorescence microscopy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 340: 159-167.
- Stankovic N., Radulovic V., Petkovic M., Vuckovic I., Jadranin M., Vasiljevic B., Nikodinovic-Runic J. 2012. *Streptomyces* sp. JS520 produces exceptionally high quantities of undecylprodigiosin with antibacterial, antioxidative, and UV-protective properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96: 1217-1231.

- Starič N., Danevčič T., Stopar D. 2010. *Vibrio* sp. DSM 14379 pigment production – a competitive advantage in the environment? *Microbical Ecology*, 60: 592-598.
- Stefanic P., Mandic-Mulec I. 2009. Social interactions and distribution of *Bacillus subtilis* pherotypes at microscale. *Journal of Bacteriology*, 191: 1756-1764.
- Stein T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56, 4:845-57.
- Stepišnik J. 1997. Fizikalni praktikum I. Ljubljana, Društvo matematikov, fizikov in astronomov Slovenije: 111 str.
- Stewart P. 2003. Diffusion in biofilms. *Journal of Bacteriology*, 185: 1485-1491.
- Stewart P.S. 1998. A review of experimental measurements of effective diffusive permeabilities and effective diffusion coefficients in biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, 59: 261-272.
- Stewart P.S., Franklin M.J. 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 6: 199-210.
- Stopar D., Cerne A., Zigman M., Poljsak-Prijatelj M., Turk V. 2004. Viral abundance and a high proportion of lysogens suggest that viruses are important members of the microbial community in the Gulf of Trieste. *Microbial Ecology*, 47: 1-8.
- Stopar D., Trček T., Štrancar J. 2002. Electron paramagnetic resonance characterization of the exopolysaccharide layer produced by bacteria. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 7, 1: 167-169.
- Subramoni S., Venturi V. 2009. LuxR-family »solos«: bachelor sensor/regulators of signalling molecules. *Microbiology*, 155: 1377-1385.
- Svensäter G., Welin J., Wilkins J.C., Beighton D., Hamilton, I.R. 2001. Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiology Letters*, 205: 139-146.
- Swaminathan R., Bickenese S., Periasamy N., Verkman A.S. 1996. Cytoplasmic viscosity near the cell plasma membrane: Translational diffusion of a small fluorescent solute measured by total internal reflection fluorescence photobleaching recovery. *Biophysical Journal*, 71: 1140-1151.
- Swidsinski A., Sydora B.C., Doerffel Y., Loening-Baucke V., Vaneechoutte M., Lupicki M. 2007. Viscosity gradient within the mucus layer determines the mucosal barrier function and the spatial organization of the intestinal microbiota. *Inflammatory Bowel Disease*, 13: 963-970.
- Sztajer H., Lemme A., Vilchez R., Schulz S., Geffers R., Yip C.Y., Levesque C.M., Cvitkovitch D.G., Wagner-Döbler I. 2008. Autoinducer-2-regulated genes in

- Streptococcus mutans* UA159 and global metabolic effect of the luxS mutation. Journal of Bacteriology, 190: 401-415.
- Štraser A. 2008. Opis lastnosti rdečega pigmenta iz naravnega izolata bakterije *Vibrio* sp. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 51 str.
- Takano E., Chakraburty R., Nihira T., Yamada Y., Bibb M.J. 2001. A complex role for the y-butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). Molecular Microbiology, 41, 5: 1015-1028.
- Tang Y.X., Wen Q., Bennett A., Kim B., Sheils C.A., Bucki R., Janmey P.A. 2005. Anionic poly(amino acid)s dissolve F-actin and DNA bundles, enhance DNase activity and reduce the viscosity of cystic fibrosis sputum. American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Biology, 289: 599-605.
- Theys T.E., Geeraerd A.H., Verhulst A., Poot K., Van Bree I., Devlieghere F., Moldenaers P., Wilson D., Brocklehurst T., Van Impe J.F.. 2008. Effect of pH, water activity and gel microstructure, including oxygen profiles and rheological characterization, on the growth kinetics of *Salmonella typhimurium*. International Journal of Food Microbiology, 128: 67-77.
- Thomas M.G., Burkart M.D., Walsh C. T. 2002. Conversion of L-proline to pyrrolyl-2-carboxyl-S-PCP during undecylprodigiosin and pyoluteorin biosynthesis. Chemical Biology, 9: 171-184.
- Thomson N.R., Crow M.A., McGowan S.J., Cox A., Salmond G.P.C. 2000. Biosynthesis of carbapenem antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control. Molecular Microbiology, 36: 539-556.
- Trutko S., Akimenko V. 1989. The role of prodigiosin biosynthesis in the regulation of oxidative metabolism of the producer *Serratia marcescens*. Mikrobiologija, 58: 723-729.
- Turnamian S.G., Binder H.J. 1990. Aldosterone and glucocorticoid receptor-specific agonists regulate ion transport in rat proximal colon. American Journal of Physiology, 258: 492-498.
- Uribe S., Sampedro J.G. 2003. Measuring solution viscosity and its effect on enzyme activity. Biological Procedures Online, 5: 108-115.
- Val D.L., Cronan J.E. Jr. 1998. *In vivo* evidence that S-adenosylmethionine and fatty acid synthesis intermediates are the substrates for the LuxI family of autoinducer synthases. Journal of Bacteriology, 180: 2644-2651.

- Valentine M.T., Dewalt L., Ou-Yang H.D. 1996. Forces on a colloidal particle in a polymer solution: a study using optical tweezers. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 8: 9477-9482.
- Varela C.A., Baez M.E., Agosin E. 2004. Osmotic stress response: quantification of cell maintenance and metabolic fluxes in a lysine-overproducing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 7: 4222-4229.
- Veening J.-W., Kuipers O.P., Brul S., Hellingwerf K.J., Kort R. 2006. Effects of phosphorelay perturbations on architecture, sporulation, and spore resistance in biofilms of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 188: 3099-3109.
- Velicer G.J., Kroos L., Lenski R.E. 2000. Developmental cheating in the social bacterium *Myxococcus xanthus*. *Nature*, 404: 598-601.
- Ventosa A., Nieto J.J., Oren A. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 2: 504-544.
- Wadhams G.H., Armitage J.P. 2004. Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5: 1024-1037.
- Walters M.C. III, Roe F., Bugnicourt A., Franklin M.J., Stewart P.S. 2003. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 317-323.
- Wang B.Y., Kuramitsu H.K. 2005. Interactions between oral bacteria: inhibition of *Streptococcus mutans* bacteriocin production by *Streptococcus gordonii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 354-362.
- Wasserman H.H., Skles R.J., Peverada P., Shaw C.K., Cushley R.J., Lipsky C.R. 1973. Biosynthesis of prodigiosin. Incorporation patterns of C-labeled alanine, proline, glycine and serine elucidated by Fourier transform nuclear magnetic resonance. *Journal of American Chemical Society*, 95: 6874-6875.
- Wei Y.H., Chen W.C. 2005. Enhanced production of prodigiosin-like pigment from *Serratia marcescens* SMΔR by medium improvement and oil-supplementation strategies. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99, 6: 616-622.
- Wen Z.T., Burne R.A. 2004. LuxS-mediated signalling *Streptococcus mutans* is involved in regulation of acid and oxidative stress tolerance and biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 186: 2682-2691.
- West S.A., Griffin A.S., Gardner A. 2007. Social semantics: altruism, cooperation, mutualism, strong reciprocity and group selection. *Journal of Evolutionary Biology*, 20, 2: 415-432.

- White D. 2000. The physiology and biochemistry of prokaryotes. 2nd ed. New York, Oxford University Press: 565 str.
- Williams P., Winzer K., Chan W.C., Cámara M. 2007. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B Biological Sciences, 362: 1119-1134.
- Williams R.P. 1973. Biosynthesis of prodigiosin, a secondary metabolite of *Serratia marcescens*. Applied Microbiology, 25: 396-402.
- Williams R.P., Quadri S.M. 1980. The pigments of *Serratia*. V: The genus *Serratia*. Von Graevenitz A., Rubin S. J. (eds.). Boca Raton, CRC Press Inc.: 31-75.
- Williamson N.R., Fineran P.C., Gristwood T., Chawrai S.R., Leeper F.J., Salmond G.P.C. 2006. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. Nature Reviews Microbiology, 4: 887-899.
- Williamson N.R., Simonsen H.T., Ahmed R.A., Goldet G., Slater H., Woodley L., Leeper F.J., Salmond G.P. 2005. Biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, in *Serratia*: identification of a novel 2-methyl-3-n-amyl-pyrrole (MAP) assembly pathway, definition of the terminal condensing enzyme, and implications for undecylprodigiosin biosynthesis in *Streptomyces*. Molecular Microbiology, 56: 971-989.
- Winzer K., Hardie K.R., Williams P. 2002. Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now - gone to lunch! Current Opinion in Microbiology, 5, 2: 216-222.
- Wirtanen G., Salu S., Matilla-Sandholm T., Allison D.G., Gilbert, P. 1998. Performance evaluation of disinfectant formulations using poloxamer-hydrogel biofilm-constructs. Journal of Applied Microbiology, 85: 965-972.
- Worku M.L., Sidebotham R.L., Baron J.H., Misiewicz J.J., Logan R.P., Keshavarz T., Karim Q.N. 1999. Motility of *Helicobacter pylori* in a viscous environment. European Journal of Gastroenterology and Hepatology, 11, 10: 1143-1150.
- Wyatt G.M., Archer D.B. 1988. Response of populations of human faecal bacteria to viscosity *in vitro*. Journal of Applied Microbiology, 64: 163–167.
- Yamamoto C., Takemoto H., Kuno K., Yamamoto D., Tsubura A., Kamata K., Hirata H., Yamamoto A., Kano H., Seki T., Inoue K. 1999. Cycloprodigiosin hydrochloride, a new H⁺/Cl⁻ symporter, induces apoptosis in human and rat hepatocellular cancer cell lines *in vitro* and inhibits the growth of hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice. Hepatology, 30, 4: 894-902.
- Yang J., Evans B.A., Rozen D.E. 2010. Signal diffusion and the mitigation of social exploitation in pneumococcal competence signaling. Proceedings of the Royal Society of London. Series B Biological Sciences, 277: 2991-2999.

- Yim G., Wang H.H., Davies J. 2007. Antibiotics as signalling molecules. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B Biological Sciences, 362, 1483: 1195-200.
- Zheng Z., Stewart P.S. 2004. Growth limitation of *Staphylococcus epidermidis* in biofilms contributes to rifampin tolerance. Biofilms, 1: 31-35.
- Zhu J., Mekalanos J.J. 2003. Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*. Developmental Cell, 5, 4: 647-656.
- Ziemann F., Radler J., Sackmann E. 1994. Local measurements of viscoelastic moduli of entangled actin networks using an oscillating magnetic bead microrheometer. Biophysical Journal, 66, 6: 2210-2216.

ZAHVALA

Mentorju prof. dr. Davidu Stoparju, ki me je povabil v svojo skupino, mi omogočil raziskovalno delo, me poslušal in podpiral moje ideje ter misteriozne eksperimente.

Članoma komisije prof. dr. Romani Marinšek Logar in prof. dr. Andreju Jamniku za prijaznost in izjemno hitrost pri pregledu in oceni naloge.

Prof. dr. Ines Mandić Mulec za pogovore, nasvete, ideje in trud.

Dr. Tjaši Danevčič, da je najboljša sodelavka, so-mentorica in prijateljica. Brez tebe se moj (raziskovalni) svet ne bi vrtel!

Najlepša hvala vsem članom katedre za mikrobiologijo, ki so moja druga družina.

Tehnološko Raziskovalnemu Centru JUB, d.o.o., še posebno Janezu Orehku, Andreju Banku, Evgenu Erženu ter Bernardi Bardutzky, da so mi omogočili meritve reologije. Brez vas bi bilo vse drugače.

Doc. dr. Mateju Butali in Simoni Kamenšek za plazmid pSC101 ter pomoč in diskusijo o SOS odzivu bakterije *E. coli*.

Prof. dr. Gang Sunu in dr. Farzaneh Alihoseini iz sončne Kalifornije za kemijsko karakterizacijo pigmenta bakterije *Vibrio ruber*.

Prof. dr. Roku Kostanjšku za elektronsko mikroskopijo bakterije *Vibrio ruber*.

Andreji Habjan za meritve vodne aktivnosti.

Lini Burkan za prijaznost in pregled naloge.

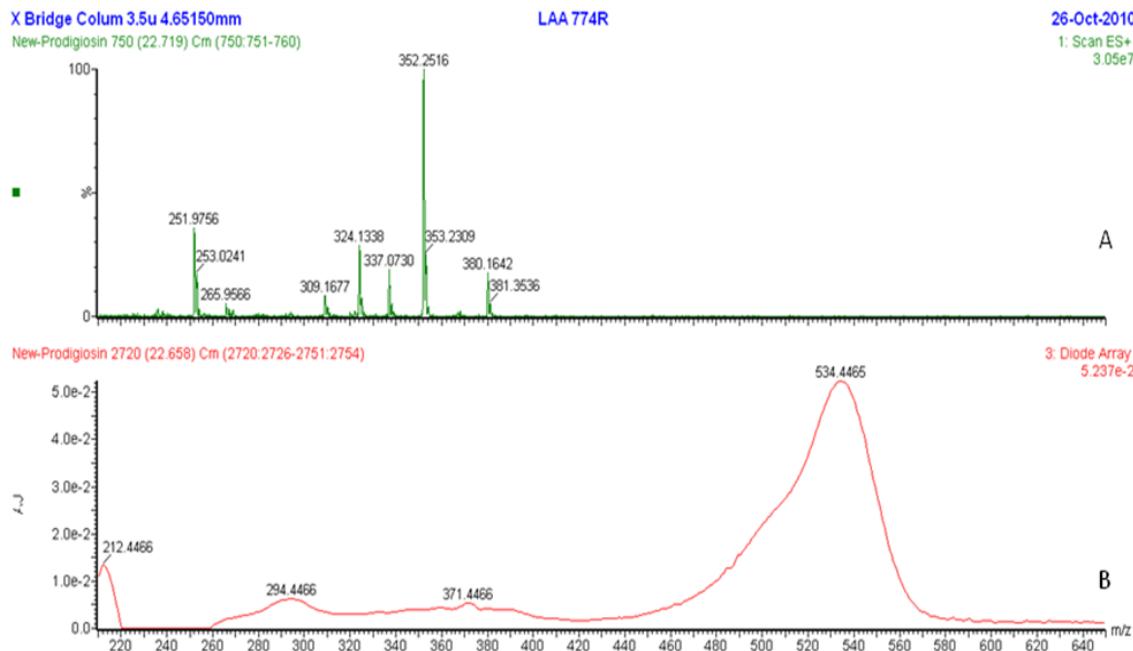
Mojim prijateljem in družini zato, ker so in zato, kar so.

In mojim mikroskopsko malim prijateljem, ki so ubogljivo sodelovali v eksperimentih in poskrbeli za razburljivost mojega dela.

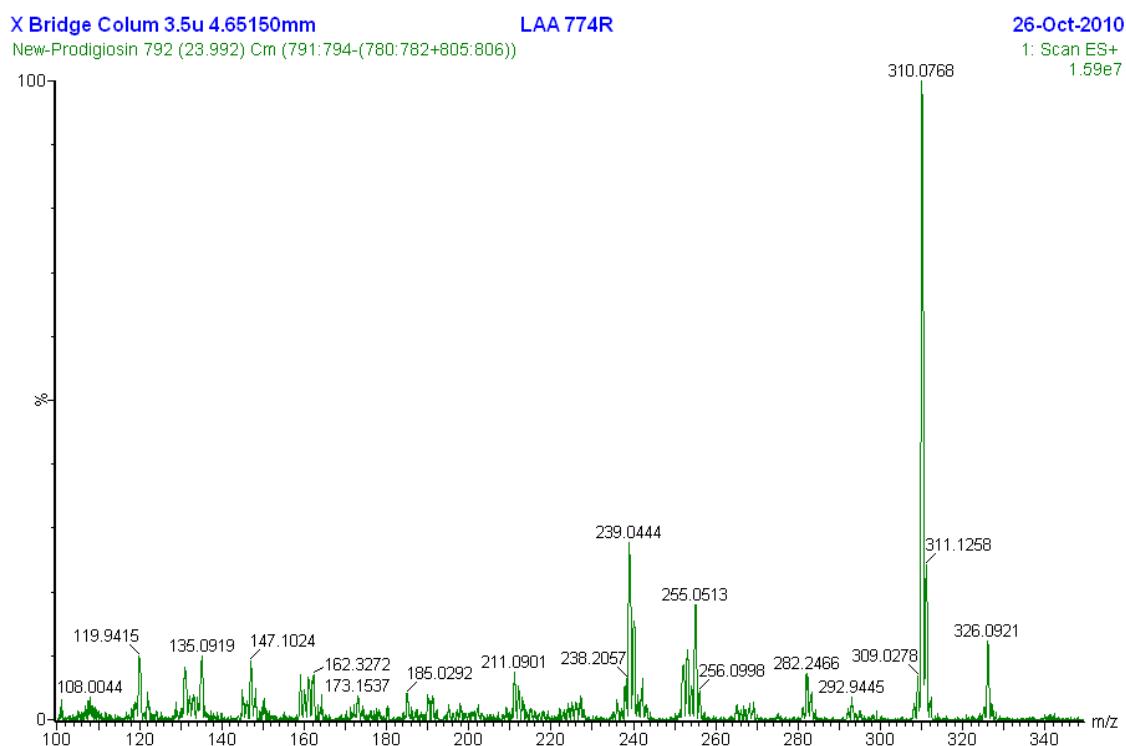
PRILOGE

Priloga A: **Rast proučevanih bakterijskih sevov na HEC kot edinem viru ogljika.**
Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n = 3$).

| Bakterijski sev | OD ₆₅₀ | |
|-----------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| | Na začetku inkubacije ($t = 0$ h) | Na koncu inkubacije ($t = 24$ h) |
| <i>V. ruber</i> DSM 14379 | 0,03 ± 0,01 | 0,02 ± 0,02 |
| <i>V. ruber</i> BM | 0,02 ± 0,01 | 0,02 ± 0,01 |
| <i>V. harveyi</i> ATCC 1116 | 0,05 ± 0,01 | 0,04 ± 0,01 |
| <i>E. coli</i> MG1655 | 0,04 ± 0,01 | 0,02 ± 0,01 |
| <i>B. subtilis</i> PS-216 | 0,02 ± 0,01 | 0,02 ± 0,01 |
| <i>Bacillus</i> sp. | 0,02 ± 0,01 | 0,02 ± 0,01 |



Priloga B: LC-MS/MS (A) in UV-VIS (B) spekter komponente N3.



Priloga C: LC-MS/MS spekter komponente N4.

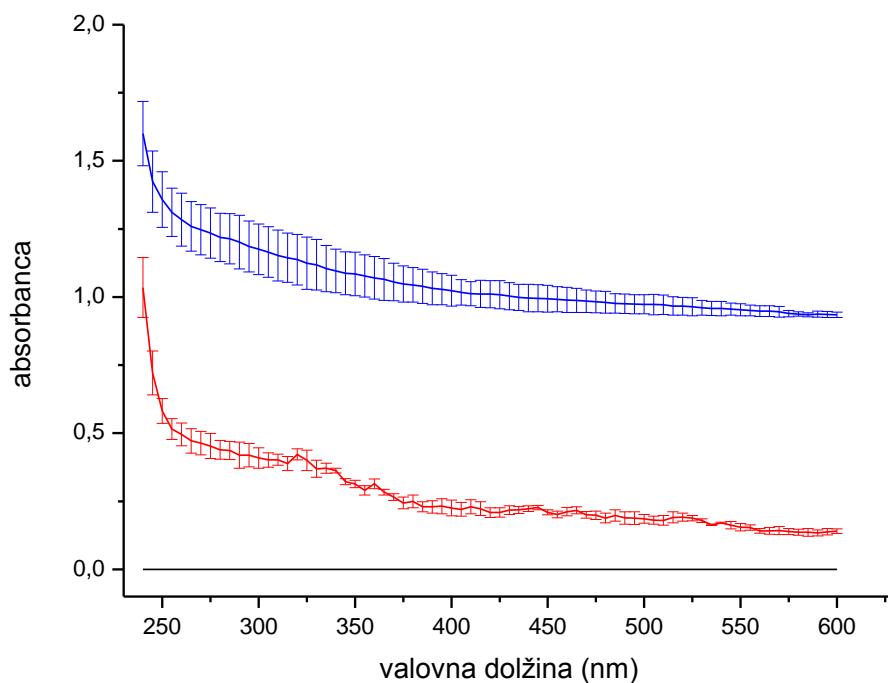
Priloga D1: Hitrost rasti in hitrost respiracije bakterije *V. ruber* pri povišani temperaturi gojenja v kombinaciji s spremenjeno viskoznostjo. Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n = 3$).

| Viskoznost (mPas) | Temperatura gojenja 37 °C | |
|----------------------|-----------------------------------|--|
| | Hitrost rasti (h^{-1}) | Hitrost respiracije ($\text{mL CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ celica}^{-1}$) $\times 10^{-12}$ |
| 0,8 | $1,34 \pm 0,03$ | $3,38 \pm 0,98$ |
| 1,3 | $1,38 \pm 0,10$ | $3,02 \pm 0,40$ |
| 2,4 | $1,20 \pm 0,12$ | $3,64 \pm 1,16$ |
| 8,0 | $1,12 \pm 0,07$ | $4,48 \pm 0,52$ |
| 29,4 | $1,23 \pm 0,10$ | $8,93 \pm 3,22$ |

Priloga D2: **Hitrost rasti in hitrost respiracije bakterije *V. ruber* pri različnih slanostih v kombinaciji s spremenjeno viskoznoščjo.** Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n = 3$).

| Viskoznost (mPas) | 0,5 % NaCl | | 10 % NaCl | |
|----------------------|-------------------------------|--|-------------------------------|--|
| | Hitrost rasti (h^{-1}) | Hitrost resipracije ($mL CO_2 h^{-1} celica^{-1}$) $\times 10^{-12}$ | Hitrost rasti (h^{-1}) | Hitrost respiracije ($mL CO_2 h^{-1} celica^{-1}$) $\times 10^{-12}$ |
| 0,8 | $0,86 \pm 0,19$ | $5,77 \pm 0,59$ | $0,43 \pm 0,05$ | $0,57 \pm 0,10$ |
| 1,3 | $0,81 \pm 0,03$ | $5,55 \pm 1,42$ | $0,39 \pm 0,02$ | $0,71 \pm 0,06$ |
| 2,4 | $0,74 \pm 0,05$ | $6,72 \pm 1,83$ | $0,28 \pm 0,04$ | $0,59 \pm 0,02$ |
| 8,0 | $0,67 \pm 0,05$ | $7,12 \pm 1,46$ | $0,29 \pm 0,03$ | $0,62 \pm 0,07$ |
| 29,4 | $0,79 \pm 0,18$ | $10,7 \pm 1,64$ | $0,33 \pm 0,02$ | $0,91 \pm 0,09$ |

Priloga E: **Absorpcijski spekter hidroksietil celuloze (HEC) v treh koncentracijah v vodi;** 0 % (črna), 0,5 % (rdeča) in 1 % (modra). Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n = 5$).



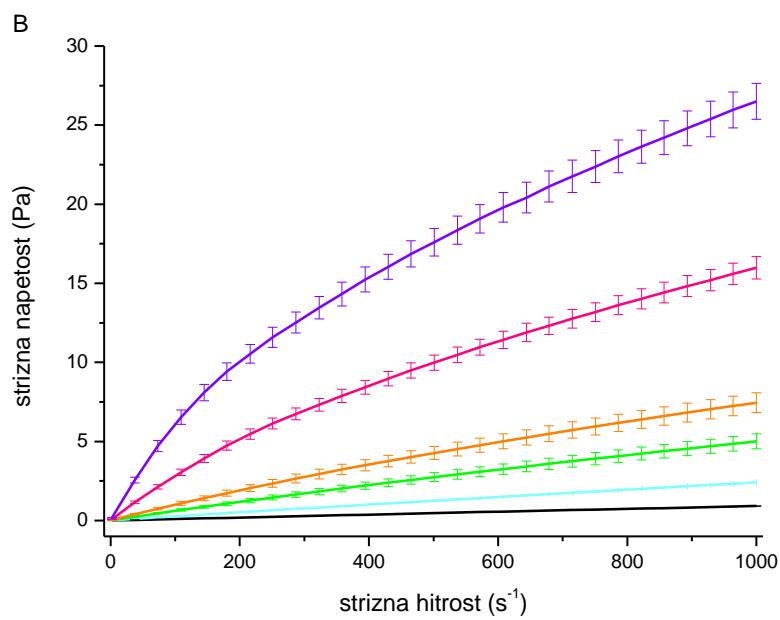
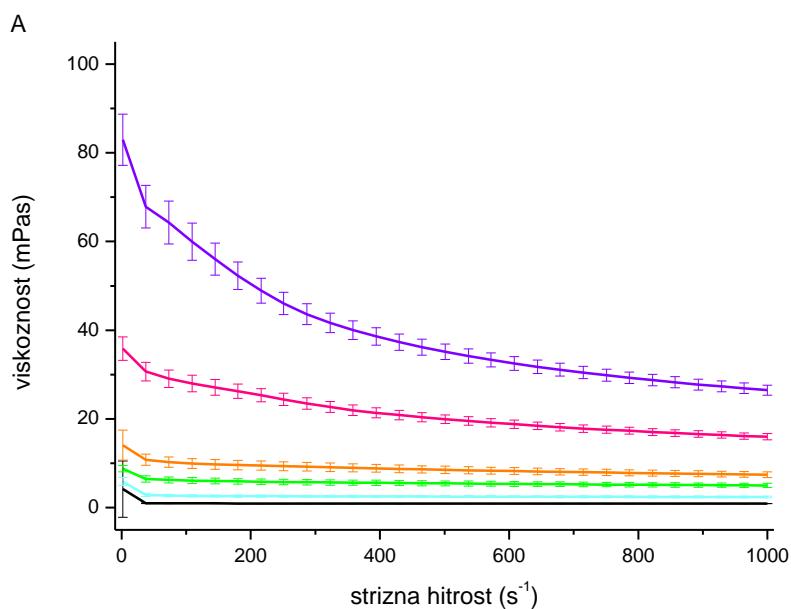
Priloga F: **Fizikalno-kemijski parametri gojišč s HEC za bakterijske seve *E. coli*, *B. subtilis*, *V. harveyi*.** Viskoznost, strižna napetost, pH in koncentracija raztopljenega kisika v minimalnem mediju M9 z različnimi koncentracijami HEC. Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n \geq 3$).

| Koncentracija HEC (%) | Viskoznost (mPas) | Strižna napetost (Pa) | pH | Koncentracija raztopljenega O ₂ (mg/L) |
|--------------------------|----------------------|--------------------------|-----------|--|
| 0 | 0,9 ± 0,1 | 0,9 ± 0,1 | 7,3 ± 0,1 | 5,4 ± 0,1 |
| 0,2 | 2,4 ± 0,2 | 2,4 ± 0,2 | 7,2 ± 0,1 | 5,3 ± 0,1 |
| 0,4 | 5,0 ± 0,5 | 5,0 ± 0,5 | 7,2 ± 0,1 | 5,3 ± 0,1 |
| 0,5 | 7,5 ± 0,6 | 7,5 ± 0,6 | 7,2 ± 0,1 | 5,3 ± 0,1 |
| 0,75 | 16,0 ± 0,7 | 16,0 ± 0,7 | 7,2 ± 0,1 | 5,3 ± 0,1 |
| 1 | 26,5 ± 1,1 | 26,5 ± 1,1 | 7,2 ± 0,1 | 5,2 ± 0,1 |

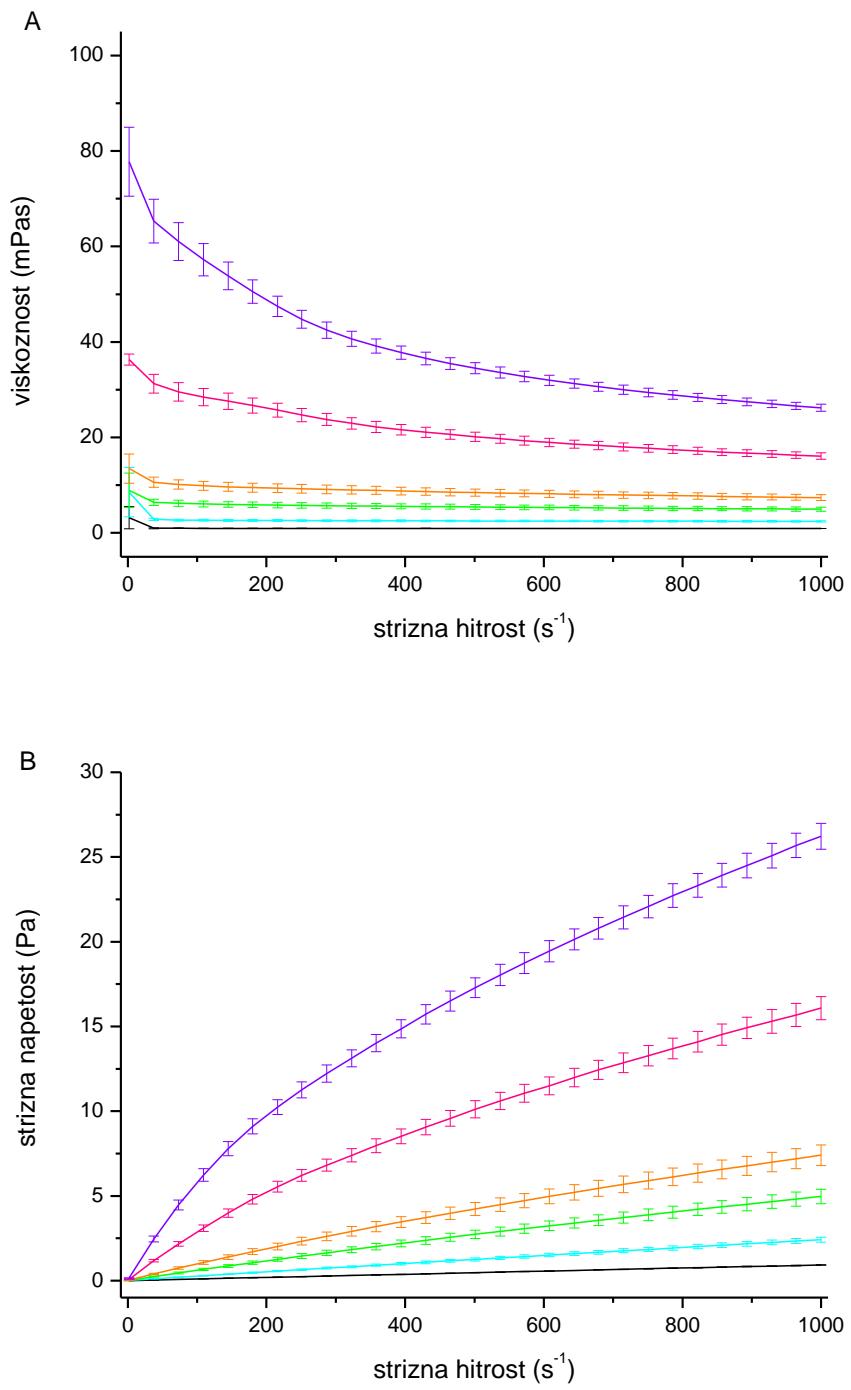
Priloga G: **Koncentracija redukcijskih koncev na začetku in koncu 24 ur rasti bakterijskih sevov *E. coli*, *B. subtilis*, *V. harveyi* v gojišču M9 z 1 % HEC kot edinim virom ogljika.** Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n = 4$).

| Bakterijski sev | Koncentracija redukcijskih koncev (mM) | | |
|-----------------------------|--|-------------------------------|------------------------------|
| | Sterilno gojišče | Na začetku inkubacije (t = 0) | Na koncu inkubacije (t = 24) |
| <i>E. coli</i> MG1655 | 1,15 ± 0,39 | 1,37 ± 0,33 | 1,22 ± 0,46 |
| <i>B. subtilis</i> PS-216 | 0,51 ± 0,19 | 0,37 ± 0,10 | 0,44 ± 0,13 |
| <i>V. harveyi</i> ATCC-1116 | 0,46 ± 0,17 | 0,49 ± 0,14 | 0,44 ± 0,05 |

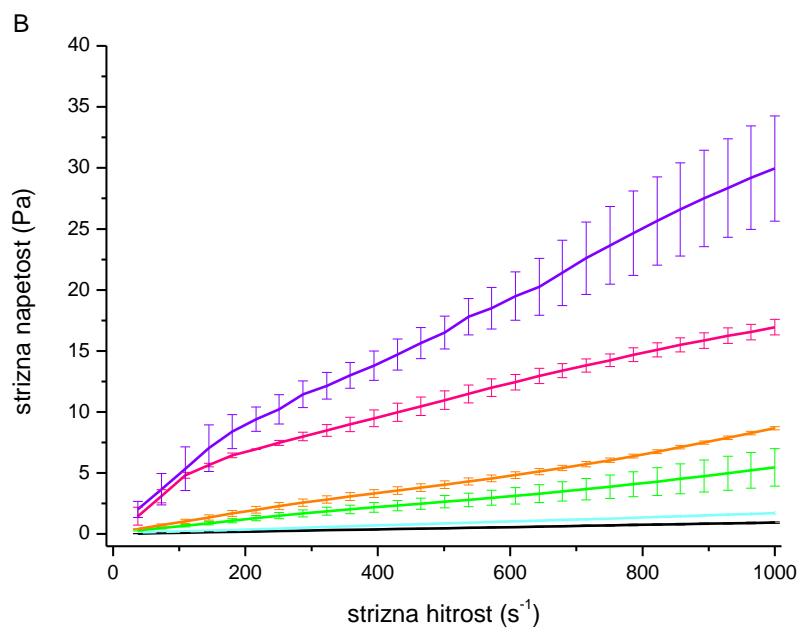
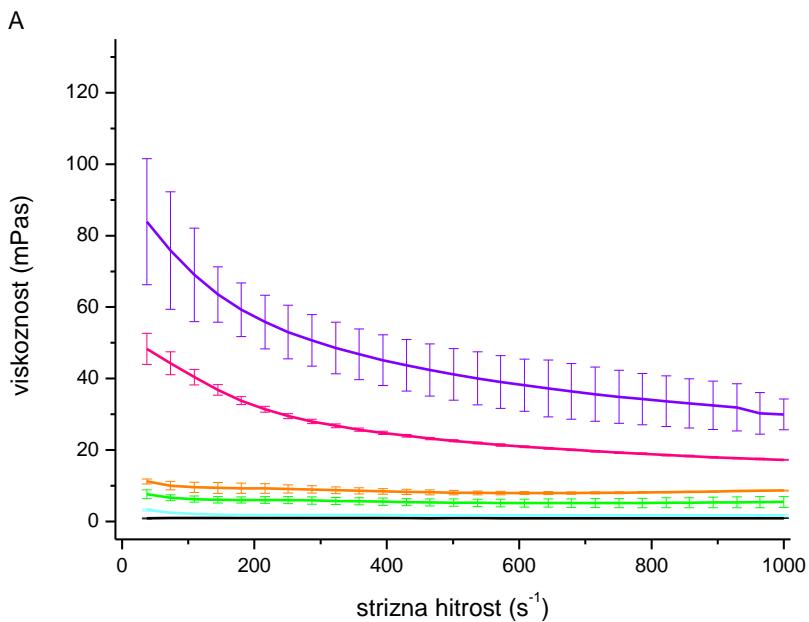
Priloga H: Reologija gojišč in bakterijskih kultur *E. coli*, *B. subtilis*, *V. harveyi* po 24 urah rasti. Koncentracija HEC je bila 0 (črna), 0,2 (svetlo modra), 0,4 (zelena), 0,5 (orange), 0,75 (roza) in 1 % (w/V) HEC (vijolična). Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni ($n \geq 3$).



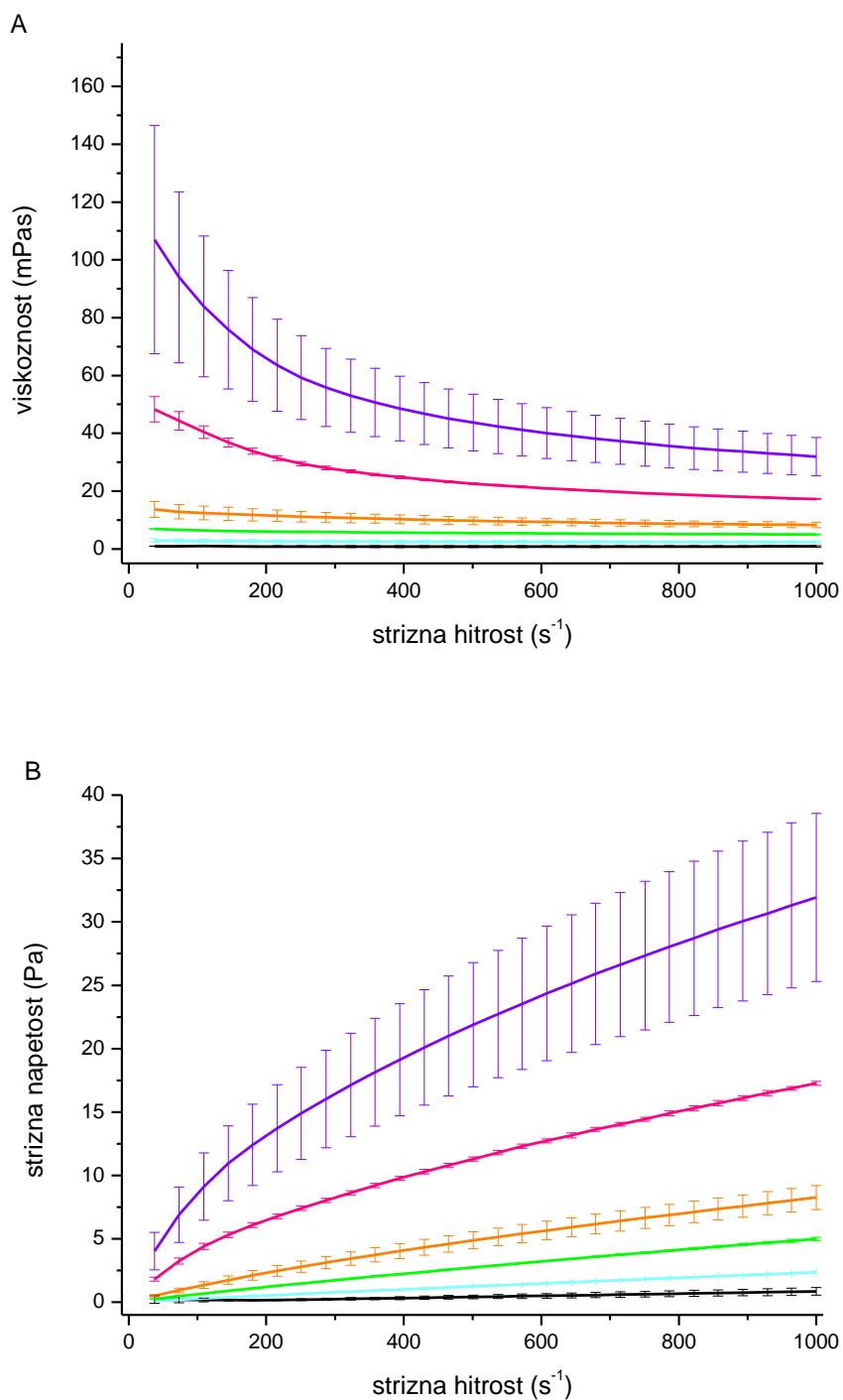
Priloga H1: Gojišča M9 z različnimi koncentracijami HEC.



Priloga H2: Reologija kultur bakterije *E. coli*



Priloga H3: Reologija kultur bakterije *B. subtilis*



Priloga H4: Reologija kultur bakterije *V. harveyi*

Priloga I: Aktivnost encimov glikolize bakterij *E. coli*, *B. subtilis* in *V. harveyi* gojenih pri različnih viskoznostih medija.

Priloga I1: Aktivnost encimov glikolize bakterije *E. coli*

| Viskoznost (mPas) | Encimska aktivnost ($\text{U mg proteina}^{-1}$) | | |
|-------------------|--|-------------------|----------------|
| | Glukoza-6-fosfat dehidrogenaza | Fosfofruktokinaza | Piruvat kinaza |
| 0,8 | 1,06 ± 0,47 | 0,08 ± 0,02 | 0,38 ± 0,18 |
| 2,4 | 2,13 ± 0,51 | 0,02 ± 0,02 | 0,14 ± 0,05 |
| 5,0 | 2,17 ± 0,22 | 0,01 ± 0,00 | 0,17 ± 0,05 |
| 7,5 | 2,13 ± 0,82 | 0,02 ± 0,01 | 0,27 ± 0,14 |
| 16,0 | 4,03 ± 0,77 | 0,03 ± 0,01 | 0,15 ± 0,02 |
| 26,5 | 4,03 ± 1,76 | 0,03 ± 0,01 | 0,04 ± 0,04 |

Priloga I2: Aktivnost encimov glikolize bakterije *B. subtilis*

| Viskoznost (mPas) | Encimska aktivnost ($\text{U mg proteina}^{-1}$) | | |
|-------------------|--|-------------------|----------------|
| | Glukoza-6-fosfat dehidrogenaza | Fosfofruktokinaza | Piruvat kinaza |
| 0,8 | 3,56 ± 0,18 | 0,03 ± 0,01 | 0,39 ± 0,19 |
| 2,4 | 2,90 ± 0,48 | 0,07 ± 0,04 | 0,16 ± 0,06 |
| 5,0 | 2,89 ± 0,37 | 0,04 ± 0,02 | 0,14 ± 0,13 |
| 7,5 | 3,13 ± 0,11 | 0,03 ± 0,01 | 0,21 ± 0,09 |
| 16,0 | 2,67 ± 0,89 | 0,02 ± 0,01 | 0,16 ± 0,10 |
| 26,5 | 3,05 ± 0,35 | 0,02 ± 0,01 | 0,34 ± 0,027 |

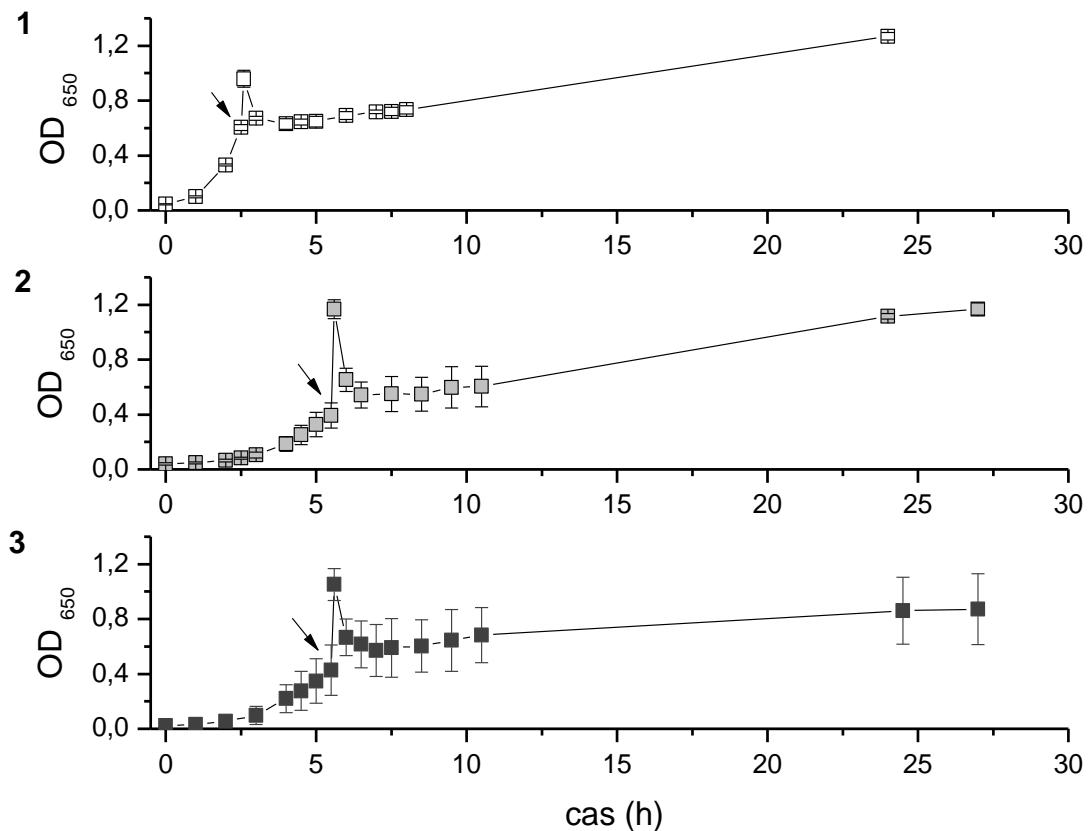
Priloga I3: Aktivnost encimov glikolize bakterije *V. harveyi*

| Viskoznost (mPas) | Encimska aktivnost (U mg proteina ⁻¹) | | |
|-------------------|---|-------------------|----------------|
| | Glukoza-6-fosfat dehidrogenaza | Fosfofruktokinaza | Piruvat kinaza |
| 0,8 | 1,81 ± 0,01 | 0,03 ± 0,01 | 0,15 ± 0,05 |
| 2,4 | 1,94 ± 0,11 | 0,03 ± 0,02 | 0,14 ± 0,09 |
| 5,0 | 2,01 ± 0,07 | 0,05 ± 0,02 | 0,52 ± 0,22 |
| 7,5 | 2,23 ± 0,15 | 0,05 ± 0,01 | 0,43 ± 0,05 |
| 16,0 | 2,15 ± 0,09 | 0,06 ± 0,01 | 0,34 ± 0,07 |
| 26,5 | 2,09 ± 0,06 | 0,09 ± 0,01 | 0,32 ± 0,07 |

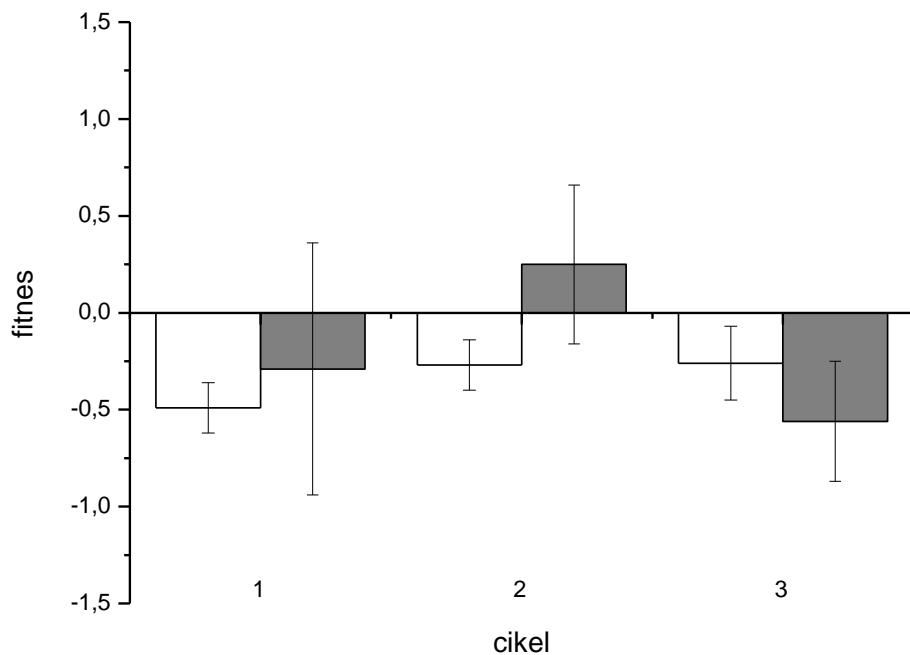
Priloga J: Koncentracija prodigiozina, ki ga je proizvedla bakterija *V. ruber* WT v kokulturah z bakterijami *V. ruber* BM, *V. harveyi*, *E. coli*, *B. subtilis* in *Bacillus* sp. Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni (n = 3).

| Viskoznost (mPas) | Koncentracija prodigiozina, ki ga je proizvedla bakterija <i>V. ruber</i> WT v kokulturi z bakterijo (mg/L) | | | | |
|----------------------|--|-------------------|----------------|--------------------|---------------------|
| | <i>V. ruber</i> BM | <i>V. harveyi</i> | <i>E. coli</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>Bacillus</i> sp. |
| 0,8 | 17,3 ± 0,8 | 26,3 ± 1,6 | 58,5 ± 1,5 | 16,3 ± 0,4 | 24,3 ± 1,1 |
| 1,3 | 10,0 ± 3,7 | 11,8 ± 1,1 | 27,0 ± 2,8 | 13,9 ± 1,2 | 13,6 ± 2,2 |
| 2,4 | 10,7 ± 0,5 | 14,5 ± 1,6 | 22,5 ± 0,4 | 15,4 ± 1,9 | 17,1 ± 1,2 |
| 8,1 | 11,7 ± 1,0 | 16,6 ± 2,0 | 15,3 ± 2,0 | 16,7 ± 3,5 | 19,4 ± 1,5 |
| 29,4 | 7,8 ± 1,8 | 14,7 ± 1,5 | 16,8 ± 3,2 | 10,6 ± 0,9 | 15,0 ± 2,6 |

Priloga K: Tretiranje bakterije *E. coli* s prodigiozinom v treh zaporednih ciklih.



Priloga K1: Kontinuirano tretiranje (številke 1, 2, 3 predstavljajo posamezen cikel) bakterije *E. coli* z 120 µg/mL prodigiozina. Puščica kaže točko tretmaja. Rezultati so prikazani kot povprečja in standardni odkloni (n = 3).



Priloga K2: Fitnes bakterije *E. coli* 5 h (beli stolpci) in 21,5 h (sivi stolpci) po tretmaju s 120 µg/mL prodigiozina v treh zaporednih ciklih.

